Aus der Abteilung für Laboratoriumsdiagnostik
von Hormon- und Stoffwechselstörungen
Direktor: Professor Dr. D. Gupta
der Kinderklinik der Universität Tübingen

ÜBER DIE WIRKUNG VON L–DOPA AUF DIE GONADOTROPINE LH UND FSH IN SERUM UND HYPOPHYSE BEI MÄNNLICHEN RATTEN VERSCHIEDENEN ALTERS

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard–Karls–Universität
Tübingen

vorgelegt von

MARTIN DOMPERT - SCHÜLKE
aus Stuttgart - Bad Cannstatt

1980

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548921_0093

Aus der Abteilung für Laboratoriumsdiagnostik
von Hormon- und Stoffwechselstörungen
Direktor: Professor Dr. D. Gupta
der Kinderklinik der Universität Tübingen

ÜBER DIE WIRKUNG VON L–DOPA AUF DIE GONADOTROPINE LH UND FSH IN SERUM UND HYPOPHYSE BEI MÄNNLICHEN RATTEN VERSCHIEDENEN ALTERS

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard–Karls–Universität
Tübingen

vorgelegt von

MARTIN DOMPERT - SCHÜLKE
aus Stuttgart - Bad Cannstatt

1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. H. Heimann
Berichterstatter: Professor Dr. D. Gupta

Druck bei H.- J. Köhler , Reprografischer Betrieb , 7400 Tübingen

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	5
2.	Literaturübersicht und Problemstellung	11
3.	Materialien	15
4.	Methoden und Versuchsbeschreibung	17
4.1.	Tierversuch und Probengewinnung	17
4.1.1.	Tiere und Tierhaltung	17
4.1.2.	Verwendete Substanz, Zubereitung der Injektionssuspension	17
4.1.3.	Versuchsaufbau	17
4.1.4.	Injektionstechnik	18
4.1.5.	Töten der Tiere	19
4.1.6.	Serumgewinnung	19
4.1.7.	Hypophysenentnahme	19
4.1.8.	Herstellung eines Homogenates der Hypophyse	20
4.1.9.	Herstellung der Homogenat-Arbeits-verdünnung	20
4.2.	Radioimmunoassay zur Bestimmung von r-LH und r-FSH	21
4.2.1.	Theorie des Radioimmunoassay	21
4.2.2.	Durchführung des Radioimmunoassay	22
4.2.3.	Jodierung des Hormons nach der Chloramin-T-Methode	25
4.2.3.1.	Theorie der Jodierung	25
4.2.3.2.	Jodierungsanleitung	26
4.2.4.	Radioaktivität des jodierten Hormons. Elutionskurven für r-LH und r-FSH	27
4.2.5.	Standardkurven für r-LH und r-FSH	29
4.2.6.	Intra- und Interassay-Variation	31
5.	Ergebnisse	32
5.1.	Datenverrechnung	32
5.2.	Gewicht der Versuchstiere	33
5.3.	Gewicht der Hypophysen	33

		Seite
5.4.	LH in Serum und Hypophyse	34
5.5.	FSH in Serum und Hypophyse	39
5.6.	FSH/LH-Relation im Serum	44
5.7.	FSH/LH-Relation in der Hypophyse	46
6.	Diskussion	49
7.	Zusammenfassung	55
8.	Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	57
9.	Abkürzungen	58
10.	Literaturverzeichnis	59

1. Einleitung

a) Die Achse Hypothalamus - Hypophyse - Gonaden. Anatomie und endokrine Funktion.

Die Keimdrüsen Hoden und Ovar der Säugetiere sind in ihrer endokrinen Funktion abhängig von den übergeordneten Zentren des Hypothalamus und der Hypophyse. Die Synthese und Inkretion der männlichen und weiblichen Geschlechtshormone, die die sexuelle Reifung mit Ausbildung der Geschlechtsmerkmale und der generativen Funktionen bewirken, sind abhängig von dem hormonellen Reiz des in der Hypophyse gebildeten Luteinisierenden Hormones LH und des Follikelstimulierenden Hormones FSH. LH und FSH werden zusammenfassend als Gonadotropine bezeichnet, weil sie als Zielorgan die Gonaden haben.

Nun ist bekannt, daß die Hypophyse ihrerseits in ihrer Funktion, die Gonadotropine zu bilden und in den Blutkreislauf abzugeben, nicht autonom ist, sondern vielmehr der Anregung aus anatomisch direkt übergeordneten Hirnzentren bedarf, die als Hypothalamus bezeichnet werden. Die hypothalamische Region umfaßt das gesamte Gebiet des Zwischenhirns, das unter dem Thalamus-Kern und damit ventral vom Sulcus hypothalamicus liegt. Die hypophysennahen Kernanteile stehen in funktioneller Beziehung zur Adenohypophyse. Träger der Informationsübermittlung zwischen Hypothalamus und Hypophyse bzw. deren gonadotropen Funktion ist das "LH releasing hormone" (LH-RH), das 1972 als Dekapeptid in seiner Struktur geklärt und synthetisiert werden konnte.

Man kann zwei Verbindungswege zwischen Hypothalamus und Hypophyse unterscheiden, das Hypophysenhinterlappensystem (HHLS) und das Hypophysenvorderlappensystem (HVLS), wobei für die Untersuchungen dieser Arbeit nur das HVLS wichtig

ist. Die Neuronen des HVLS (Tractus tuberohypophyseus) erreichen den HVL nicht, sondern endigen an Blutgefäßkapillarschlingen, "die in den proximalen Teil der Neurohypophyse (Infundibulum = 'median eminence') eindringen. Diese Gefäße gehören zum sog. Portalgefäßsystem der Adenohypophyse und sind mit den Sinus des HVL und dadurch mit den Drüsenzellen desselben durch die sog. Portalgefäße direkt verbunden. Der Blutstrom in diesen Portalgefäßen fließt - nach neuesten Untersuchungen - in zwei Richtungen: von proximal nach distal, aber auch umgekehrt. Man nimmt heute an, daß die Endaufsplitterungen des Tractus tuberohypophyseus neurosekretorische Aktivität besitzen und Neurohormone von Polypeptidcharakter (die Releasing- und Inhibiting-Faktoren) bilden bzw. speichern." (NOWAKOWSKI 1977)

Der hier beschriebene funktionelle Zusammenhang zwischen Releasing Faktor, Gonadotropinen und Sexualhormonen - bzw. deren anatomischen Substraten Hypothalamus, Hypophysenvorderlappen und Gonaden - arbeitet nach den Grundsätzen eines Regelkreises mit negativer Rückkoppelung. Schon 1932 wurde dieser negative feedback zwischen Gonaden und HVL als Element der Geschlechtsentwicklung bei Ratten von MOORE und PRICE (1932) vermutet. Abb. 1 zeigt stark vereinfacht diese Regelkreisbeziehungen bei einem männlichen Säugetier.

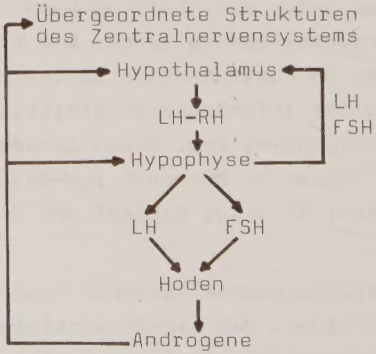


Abb. 1: Schema des Regelkreises der Strukturen Hypothalamus - Hypophyse und Hoden bei einem männlichen Säugetier

Es ist bis heute nicht eindeutig geklärt, an welchen Stellen dieses Regelsystems welche Veränderungen statthaben, um die sexuelle Reifung und insbesondere den Eintritt der Pubertät zu bewirken. "... what initiates puberty still remains a biological mystery. The difficulties in understanding the underlying processes arise from the fact that reproductive maturity does not have a single determinant, but a multiple of determinants, each influencing the other in a complex way." (GUPTA 1977) (... was die Pubertät beginnen läßt, bleibt noch immer ein biologisches Geheimnis. Die Schwierigkeiten im Verständnis der zugrundeliegenden Prozesse erwachsen aus der Tatsache, daß die Geschlechtsreifung nicht nur einem, sondern mehreren bestimmenden Faktoren unterliegt, die sich wechselseitig in komplexer Weise beeinflussen.) Es wird vermutet, daß die Hauptveränderung, welche das Signal zum Eintritt der Pubertät setzt, im Hypothalamus stattfindet (GUPTA 1977). "But this does not infer that the hypothalamus is master of itself and functions in a physiological vacuum." (GUPTA 1977) (Aber dies heißt nicht, daß der Hypothalamus sein eigener Herr ist und in einem physiologischen Vakuum seine Funktion ausübt.) Wichtig ist nach GUPTA zu beachten, daß schon vor Pubertätseintritt die Hauptbildungsorte der Sexualsteroide, nämlich Hoden und Ovar, in der Lage sind, diese Hormone zu bilden; aber erst wenn das Signal vom hypothalamisch-hypophysären System gesetzt wird, werden die Geschlechtshormone in einer für die Pubertätsentwicklung ausreichenden Menge gebildet.

Ein durch experimentelle Befunde naheliegendes Konzept von Regelkreisveränderungen während der Geschlechtsentwicklung hat GUPTA neben anderen Forschern in der "hypothesis of differential sensitivity" zusammengefaßt (GUPTA 1977). Zwei Gesichtspunkte dieser Hypothese der veränderlichen Empfindlichkeit, die den Eintritt der Pubertät erklären helfen soll, seien aufgeführt:

"1) The presence of a negative feedback control of the secretion of gonadotropins before puberty which exhibits

a change in sensitivity (or set point) with the onset of puberty.

2) The change in pituitary sensitivity to LH-RH at puberty and the qualitative change in the LH-response." (GUPTA 1977)

(1) Die präpubertäre Existenz einer Kontrolle der Gonadotropinsekretion mit negativer Rückkoppelung, die mit Beginn der Pubertät eine Änderung der Empfindlichkeit des Gonadostaten erfährt.

2) Zu Pubertätsbeginn eine Änderung der hypophysären Ansprechbarkeit auf LH-RH und ein qualitativer Wechsel in der LH-Antwort.)

b) Die Rolle der Neurotransmitter

Es wird heute allgemein anerkannt, daß Neurotransmitter des Zentralnervensystems die Abgabe aller Hormone des Hypophysenvorderlappens (HVL), also auch der Gonadotropine, beeinflussen (COLLU 1977). Neurotransmitter sind die Mediatoren der Überleitung von nervalen Impulsen an der synaptischen Verbindungsstelle zweier Neurone. Ungeklärt ist der Mechanismus der Interaktion von Neurotransmitter, hypophyseotropen Releasing-Faktoren des Hypothalamus und hypophysären Gonadotropinen. COLLU (1977) gibt im wesentlichen drei Hypothesen dieser Interaktion wieder. Die erste und weithin anerkannte Vorstellung ist, daß in extra- oder intrahypothalamischen Neuronen gebildete Neurotransmitter an der Synapse mit einem peptidergen Neuron freigesetzt werden und dabei selbst die Freisetzung von hypothalamischen Hormonen in das Portalgefäßsystem der Hypophyse regeln. Diese hypothalamischen Hormone wiederum zeigen sich für den Release der HVL-Hormone verantwortlich. Die zweite Hypothese geht von hypothalamischen Neuronen aus, die sowohl Neurotransmitter als auch hypothalamische Hormone bilden. Die Interaktion der beiden letztgenannten soll nun im Neuron selbst oder auf hypophysärem Niveau möglich sein. In den Hypothesen 3 und 4 wird eine Abgabe von Neurotransmitter und hypothalamischem Hormon in die Liquorräume des III. Ventrikels postuliert (COLLU 1977).

c) Katecholaminerge Neurotransmitter

Von allen möglichen Neurotransmittern sind bisher noch am besten Acetylcholin, Noradrenalin, Dopamin und Serotonin untersucht. Die Rolle der cholinergen Neurotransmitter bleibt hier unbetrachtet.

Die Synthese der Katecholamine zeigt als ersten und zugleich limitierenden Schritt die Umwandlung der Aminosäure Tyrosin zu Dopa durch das Enzym Tyrosin - 3 - hydroxylase. Das Enzym Dopadecarboxylase katalysiert die Reaktion von Dopa zu Dopamin. In den dopaminergen Neuronen bricht die Synthesekette auf dieser Stufe ab, während in den noradrenergen Neuronen und im Nebennierenmark mit Hilfe der Dopamin-ß-hydroxylase Noradrenalin und schließlich durch die Phenyläthanolamin-N-methyltransferase Adrenalin entsteht (GROBECKER, H., HELLENBRECHT, D., PALM, D. 1975). Es besteht ein Aminspeichermechanismus für neu gebildete Neurotransmitter innerhalb der Neurone; Nervenimpulse setzen den Transmitterstoff, z. B. Dopamin in den synaptischen Spalt frei (FUXE 1978). 10 % der Katecholamine werden durch die Katechol-O-Methyltransferase abgebaut, während 90 % über aktiven Transport in die Nervenzellendigung wieder aufgenommen werden. Nur ein kleiner Anteil wird durch die Monoaminoxydase abgebaut (COLLU 1977).

d) Die Theorie der postsynaptischen Dopamin-Rezeptoren

Nach FUXE (1978) soll der angenommene Dopamin-Rezeptor mit einer Dopamin-empfindlichen Adenyl-Zyklase verbunden sein; diese aktiviert eine membrangebundene Proteinkinase, die selbst wiederum durch die Phosphorylierung bestimmter Membranproteine der Synapse eine Permeabilitätsänderung der synaptischen Membrane für Jonen induziert. Auf der Zellmembran von Dopamin-Nervenzellen sollen zusätzlich Autorezeptoren für Dopamin an der negativen Rückkoppelung für Synthese und Freisetzung des Dopamin beteiligt sein (FUXE 1978).

Mit Tritium-markiertem Dopamin gelang BROWN et al. (1976)

der Nachweis von Dopamin-Rezeptoren in der Hypophyse; im Gebiet des basalen Hypothalamus und der Eminentia mediana fanden sich keine Dopamin-bindenden Rezeptoren, woraus BROWN et al. schließen, daß hier auch keine postsynaptischen Dopamin-Effekte erzielt werden. Vielmehr lege auch die Anatomie nahe, daß Dopamin vom Hypothalamus durch das Portalgefäßsystem der Hypophyse gelangt und hier direkt den Release der hypophysären Hormone steuert (BROWN et al. 1976). Demgegenüber berichteten FUXE und HÖKFELT (1970), daß Dopamin mit großer Wahrscheinlichkeit auf der Ebene der Eminentia mediana und nicht auf hypophysärem Niveau die LH-Sekretion beeinflußt: wird Hypophysenvorderlappengewebe mit Dopamin inkubiert, zeigen sich keine Änderungen des LH-Spiegels im inkubierten Medium.

2. Literaturübersicht und Problemstellung

Die Wirkung des Neurotransmitters Dopamin auf die Gonadotropine LH und FSH wurde in den letzten Jahren mit unterschiedlichen Versuchsansätzen und teilweise widersprechenden Ergebnissen am Tier untersucht.

1) In vitro-Versuche am inkubierten Medium

a) Nach KAMBERI et al. (1969) setzte Hypophysengewebe, das im Plasma von Dopamin-vorbehandelten Ratten inkubiert war, mehr LH frei, als wenn Plasma von nicht vorbehandelten Tieren zum Medium zugegeben wurde.

b) SCHNEIDER und MC CANN (1969) inkubierten Gewebe vom Hypophysenstiel und der Eminentia mediana erwachsener Ratten und fanden einen signifikant gesteigerten LH-Release, wenn Dopamin zum Medium zugegeben wurde. Durch den α-Rezeptorenblocker Phentolamin war dieser Effekt völlig aufgehoben.

c) ROTSZTEJN et al. (1977) gaben ebenfalls Dopamin einem inkubierten Medium von Hypothalamusgewebe männlicher erwachsener Ratten zu und fanden einen dosisabhängigen LH-RH-Anstieg, der von der Anwesenheit der Sexualsteroide abhängig zu sein schien, da er sich nicht zeigte bei Verwendung von Hypothalamusgewebe zuvor orchidektomierter Ratten.

2) Im in vitro-Versuch unter Anwendung des Histofluoreszenz-Verfahrens zum Studium des Dopamin-Umsatzes konnten FUXE et al. (1974) demgegenüber zeigen, daß eine Steigerung der Dopamin-Aktivität in der Eminentia mediana mit einem Abfall der Gonadotropine einhergeht.

3) In vivo-Versuche mit topischer (intraventrikulärer) Gabe von Dopamin

a) Intraventrikuläre Injektion von Dopamin erbrachte einen

signifikanten Anstieg von LH bei weiblichen Ratten (SCHNEIDER und MC CANN 1970 a und b).

b) KAMBERI et al. (1970) fanden 120 min nach intraventrikulärer Gabe von 1,25 ug Dopamin einen Zuwachs des Serum-LH um das 20-fache. Für höhere Dosen Dopamin ergaben sich mit steigender Dosis abnehmende Spiegel des Luteinisierenden Hormones: 2,5; 5; 10 und 100 ug Dopamin ergaben mittlere LH-Spiegel von 16,9; 13,4; 10,3 und 1,3 ng/ml.

c) SAWYER et al. (1974) konnten nicht nur keine LH-Zunahme im Serum nach intraventrikulärer Infusion von Dopamin feststellen, sondern fanden darüberhinaus, daß Dopamin in der Lage ist, den LH-stimulierenden Effekt von Noradrenalin zu blockieren.

4) In vivo-Versuche mit Applikation von Hemmstoffen der Dopamin-Synthese

a) Intraperitoneale Gabe von α-Methyltyrosin, einem Blocker der Dopamin- und Noradrenalin-Biosynthese, ließ den Prolaktinspiegel im Serum erwachsener männlicher und weiblicher Ratten zwar drastisch ansteigen, veränderte aber den LH- und FSH-Gehalt im Serum nicht (DONOSO et al. 1971).

b) COCCHI et al. (1974) gaben α-Methyltyrosin 24 bzw. 48 Stunden nach Gonadektomie präpubertären Ratten. α-Methyltyrosin war nicht in der Lage, den der Gonadektomie folgenden LH-Anstieg zu verhindern. Mit Bis- (4 - methyl - 1 - homopiperazinil - thiocarbonil) disulfide (FLA 63), einem selektiven Blocker der Noradrenalin-Synthese, wurde der LH-Anstieg nach Gonadektomie in allen präpubertären Altersgruppen unterdrückt. Aus beiden Befunden ziehen COCCHI et al. (1974) die Schlußfolgerung, daß Dopamin keine stimulierende Rolle im regelkreisbedingten LH-Anstieg nach Entfernung der Gonaden spielt, wohl aber Noradrenalin.

5) In vivo-Versuche mit direkter Applikation von Dopamin

a) DONOSO et al. (1971) fanden nach Gabe von 10 bzw. 40 mg L-Dopa/100 g Körpergewicht bei erwachsenen männlichen und

weiblichen Ratten keine Änderungen des LH- und FSH-Musters im Serum, wohl aber des Prolaktins.

b) Nach intraperitonealer Applikation von 3 mg bzw. 30 mg L-Dopa zeigten sich in Versuchen von WATKINS et al. (1975) alters- und konzentrationsabhängige LH-Erhöhungen bei weiblichen Ratten im Serum. Die niedrige Dosis erhöhte LH nur bei den jungen Tieren (young estrous), die 30 mg-Dosis erhöhte LH in allen Altersgruppen, ausgenommen die älteren, pseudoschwangeren Tiere.

Die widersprechenden Befunde, die aus den Tierversuchen hervorgehen, werden noch verwirrender, wenn man den Einfluß von L-Dopa auf die Gonadotropine beim Menschen berücksichtigt:

1) Dopamin-Infusion von 4 ug/kg Körpergewicht ergab bei gesunden Versuchspersonen einen signifikanten Abfall von LH mit einem deutlichen Rebound-Effekt nach Infusionsende. Signifikante FSH-Veränderungen wurden nicht beobachtet (LEBLANC et al. 1976).

2) EDDY et al. (1971) fanden nach peroraler L-Dopa-Gabe an gesunden Versuchspersonen keine LH- und FSH-Veränderungen im Serum, während das Wachstumshormon von der L-Dopa-Dosis abhängig deutlich anstieg.

3) Bei kindlichen und jugendlichen Patienten mit konstitutionellem Minderwuchs ergab die orale Gabe von L-Dopa keine Wirkung auf die Gonadotropine, wohl aber zeigten sechs von sieben konstitutionell Minderwüchsigen einen deutlichen Anstieg des Wachstumshormons nach L-Dopa (HAYEK et al. 1972).

Die hier wiedergegebenen, sich widersprechenden Befunde lassen es angezeigt erscheinen, die Wirkung von systemisch appliziertem L-Dopa auf die Gonadotropine LH und FSH zu untersuchen. Die in vivo-Versuche mit systemischer Applikation von L-Dopa konnten diese Frage bisher nicht eindeutig beantworten, zudem wurden in der Arbeit von DONOSO et al. (1971) nur erwachsene Tiere berücksichtigt; die

ausgeführte Arbeit von WATKINS et al. (1975) ließ FSH außer Betracht.

In der vorliegenden Arbeit soll deshalb geklärt werden, ob es bei systemischer Applikation von L-Dopa an männliche Ratten verschiedener Reifestufe

1) eine gleichsinnige Wirkung auf die Hormone LH und FSH gibt,
2) eine Altersabhängigkeit der L-Dopa-Wirkung auf die Gonadotropine gibt,
3) diese Wirkung abhängig ist von der applizierten Dosis L-Dopa.

Die Frage, ob sich die bekannte Altersabhängigkeit der LH- und FSH-Antwort auf die Applikation von LH-RH (GUPTA und EICHNER 1977) nach Applikation von L-Dopa wiederholen könnte, erscheint wichtig, um die Hypothese der "differential sensitivity" (GUPTA 1977), die Annahme einer veränderlichen Empfindlichkeit des Reglers für die Gonadotropinsekretion, auf hypothalamischem Niveau überprüfen zu können.

LH und FSH soll in Serum und Hypophysengewebe bestimmt werden, da nur so über etwaige Änderungen in Syntheseleistung und Release der Hormone Aussagen gemacht werden können.

Da Dopamin als Monamin nicht in der Lage ist, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren, mußte auf dessen biosynthetischen Vorläufer, das L-Dopa, zurückgegriffen werden.

3. Materialien

Chemikalien von:

Fa. MERCK, Darmstadt:

3, 4 Dihydroxy L-phenylalanin (L-Dopa)	Nr. 4196
Dinatriumhydrogenphosphat x 2 H_2O	Nr. 6580
Natriumdihydrogenphosphat x 2 H_2O	Nr. 6345
Natriumchlorid	Nr. 6404
Kaliumjodid neutral	Nr. 5043
Chloramin T (Trihydrat)	Nr. 2426
Äthylendinitrilotetraessigsäure EDTA	Nr. 8436
Bromphenolblau	Nr. 8122
Natriumpyrosulfit	Nr. 6528

Fa. SERVA-Feinbiochemika, Heidelberg:

Saccharose reinst	Nr. 35580
Äthylmercurithiosalicylsäure	Nr. 11375

WELLCOME Reagents Ltd., Beckenham, England:

Rabbit Serum inactivated

Precipitating Serum for Radioimmunoassay (Anti-Rabbit Gamma-Globulin)

RADIOCHEMICAL CENTRE Amersham:

Jod-125 (Na-Salz) IMS 30

BEHRINGWERKE, Marburg/Lahn:

Rinderserumalbumin

NATIONAL INSTITUTE OF ARTHRITIS, METABOLISM AND DIGESTIVE DISEASES (NIAMDD) RAT PITUITARY HORMONE DISTRIBUTION PROGRAM, Bethesda MD., USA:

Purified Rat Luteinizing Hormone (NIAMDD-Rat LH-I-3)

Antiserum to Rat Luteinizing Hormone (NIAMDD-Anti-Rat LH Serum-1)

Reference Preparation (NIAMDD-Rat LH-RP-1)

Purified Rat Follicle Stimulating Hormone
(NIAMDD-Rat FSH-I-1)

Antiserum to Rat Follicle Stimulating Hormone
(NIAMDD-Anti-Rat FSH Serum-6)

Reference Preparation (NIAMDD-Rat FSH-RP-1)

Phosphate buffer saline (PBS)
(Elutionspuffer für die Jodierung): pH 7,6

13,2 ml 0,1 M NaH_2PO_4 x 2 H_2O
+ 86,8 ml 0,1 M Na_2HPO_4 x 2 H_2O
+ 8,7 g NaCl = 0,15 M
+ 100 mg Merthiolat = 0,01 %
ad 1000 ml H_2O dest. = 0,01 M Phosphat-puffer

Diluent: pH 7,6

PBS
+ 1 % Rinderserumalbumin

Assaypuffer: pH 7,6

PBS
+ 18,6 g EDTA
+ 3 ml Rabbitserum inactivated
ad 1 l H_2O dest.

Transferlösung:

1 % KJ
+ 16 % Sucrose in PBS
+ Bromphenolblau (Spur)

2 % BSA-Lösung (BSA = Bovines Serumalbumin):

2 g Rinderserumalbumin in PBS für die Jodierung

4. Methoden und Versuchsbeschreibung

4.1. Tierversuch und Probengewinnung

4.1.1. Tiere und Tierhaltung

Die Tiere, die im hier zu berichtenden Experiment verwendet wurden, waren sämtlich männliche Wistar-Ratten des IVANOVAS-Stammes (bezogen von: S. IVANOVAS GmbH & Co., Medizinische Versuchstierzuchten KG, Kisslegg/Allgäu). Sie wurden am Morgen des dem Versuchstag vorangehenden Tages per Bahn Express in die Klinik geliefert und sogleich in Gemeinschaftskäfigen untergebracht (5 Tiere in einem Käfig). Von 6.00 - 19.00 Uhr waren die Tiere künstlichem Licht ausgesetzt, Wasser und Nahrung bekamen sie ad libitum.

4.1.2. Verwendete Substanz, Zubereitung der Injektions-Suspension

Als Ausgangssubstanz wurde 3,4 Dihydroxy-L-phenylalanin (L-Dopa), $C_9H_{11}NO_4$, verwendet, das als Trockenpulver von der Fa. MERCK mit der Artikel-Nr. 4196 bezogen wurde. Von dieser Substanz und 0,9 % NaCl-Lösung wurde eine Injektions-Suspension hergestellt. Die Suspension wurde am Morgen des jeweiligen Versuchstages frisch angesetzt. Über die ganze Versuchszeit konnte mit Hilfe eines Rotomix-Gerätes eine annähernd gleichmäßige Verteilung der Suspensionspartikel erreicht werden. Das schlechte Löslichkeitsverhalten von L-Dopa gestattete nicht die Fertigung einer Injektionslösung.

4.1.3. Versuchsaufbau

Im Versuch wurden Tiere der Altersgruppen 20 Tage, 35 Tage und 90 Tage verwendet. Die folgende Tabelle gibt die Anzahl der Tiere einer Altersgruppe für die jeweiligen Versuchsbedingungen wieder:

"0 '"		15 '	60 '	120 '	240 '
14 unbehandelte Kontrolltiere	L-Dopa 1 mg/ 100 g	5	5	5	5
	L-Dopa 10 mg/ 100 g	5	5	5	5
	0,9 % NaCl-Lösung	4	4	4	4

Tab. 1: Anzahl der Tiere einer Altersgruppe für die jeweiligen Versuchsbedingungen

Die oberste Tabellenreihe gibt die zwischen Injektion und Dekapitation der Tiere verstrichene Zeit (in Minuten) an.

35 Tiere einer Altersgruppe konnten an einem Versuchstag bewältigt werden, dabei wurde nach einem genauen Zeitplan verfahren. Vorgesehen waren dabei:

5 Minuten für
- Holen des Tieres aus dem Tierstall in einem Einzelkäfig
- Abwiegen des Tieres auf 1 g genau
- Aufziehen der Injektions-Suspension und Injektion
- Zurückbringen des Tieres in den Tierstall

(Das Tier verblieb bis zum Zeitpunkt des Tötens im Einzelkäfig.)

10 Minuten für
- Holen des zuvor injizierten Tieres aus dem Tierstall
- Dekapitation
- Blutgewinnung
- Hypophysenpräparation
- Versorgung des Hypophysenpräparates.

4.1.4. Injektionstechnik

Unter sorgfältig gestraffter Bauchdecke (durch Ziehen an einem Bein des Tieres) wurde in die linke Seite des Unterbauches das bei jedem Tier identische Volumen von 0,5 ml (Dopa-Suspension mit der genau berechneten Dopa-Menge bzw. 0,9 % NaCl-Lösung) injiziert. Dabei wurde darauf geachtet,

daß man in jedem Falle die zuweilen sehr dünne Bauchmuskulatur ebenfalls durchstochen hatte, um eine einwandfrei intraperitoneale Injektion zu gewährleisten. Verwendet wurde eine Kanüle Nr. 17, aufgezogen wurde mit einer Tuberkulinspritze. Sofort nach der Injektion wurde das Tier in seinen Einzelkäfig und dann in den Tierstall zurückgebracht.

Zur Kontrolle wurde bei einer Stichprobe von Tieren aus jeder Altersgruppe nach beendeter Dekapitation, Blutgewinnung und Hypophysenpräparation der Bauch ganz eröffnet, um die regelrechte intraperitoneale Injektion inspektorisch überprüfen zu können.

4.1.5. Töten der Tiere

Nach Verstreichen der für jedes Tier festgelegten Zeit wurden die Tiere aus ihrem Käfig geholt. Sogleich wurde ihnen mit wenigen Scherenschlägen der Kopf am Übergang des Hinterhauptes in die Halswirbelsäule abgetrennt. Mit Hilfe eines untergestellten Trichters wurde das Blut in einem Zentrifugenröhrchen aufgefangen.

4.1.6. Serumgewinnung

Nachdem das Blut in einem Zentrifugenröhrchen aufgefangen worden war, blieb es mindestens 1 Stunde, jedoch nicht länger als 1 1/2 Stunden, bei Zimmertemperatur stehen. Kurz vor der Zentrifugation wurde der geronnene Anteil mit Hilfe eines Glasstabes von der Wandung des Zentrifugenröhrchens gelöst. Das Abzentrifugieren erfolgte bei 3000 U/min über 10 Minuten. Anschließend wurde das Serum abpipettiert. Alle Serumproben wurden sogleich bei - 20 ^{o} Celsius eingefroren und bei dieser Temperatur bis zur Weiterverwendung im Radioimmunoassay aufbewahrt.

4.1.7. Hypophysenentnahme

Sofort nach Abtrennen des Kopfes wurde dieser mit vier Nadeln auf einer Korkplatte fixiert und das Schädeldach von occipital nach rostral längs gespalten. Entfernung der knöchernen Anteile und Abtragung des Großhirns schlos-

sen sich an. Damit war die Schädelbasis übersichtlich dargestellt. Der lateral der Fossa hypophysealis vorbeiziehende Nervus opticus wurde beidseits entfernt, die bindegewebige Tunica der Hypophyse mit scharfem Skalpell inzidiert und entfernt. Damit war eine stumpfe Herausnahme der Hypophyse möglich. Das Drüsengewebe wurde von eventuell anhaftenden Kapselanteilen befreit und kurz auf einer Zellstoffunterlage abgetupft. Die so präparierte Drüse wurde sofort an die Innenwand eines zuvor abgewogenen und in Trockeneis vorgekühlten Kunststoffhütchens gebracht. Das Hütchen wurde sogleich in Trockeneispartikel eingebracht und im Verlauf einer Stunde in der Kühltruhe bei - 80 ^{o} Celsius schockgefroren.

4.1.8. Herstellung eines Homogenates der Hypophyse

Die tiefgefroren gelagerten Hypophysen wurden aufgetaut und mitsamt ihres Behälters mit der Analysenwaage abgewogen. Die Wägegenauigkeit betrug 10^{-5} g. Danach wurde das Drüsengewebe 2 Minuten lang in 1 ml Phosphatpuffer (pH 7,6) homogenisiert (Homogenisator von JANKE & KÜNCKEL KG, Staufen/Breisgau, Typ RM 14). Nach Auskippen des Homogenats wurde mit 1 ml desselben Puffers das Homogenisationsgefäß gespült und das Spülvolumen mit dem Homogenat vereinigt.

4.1.9. Herstellung der Homogenat-Arbeitsverdünnung

Direkt im Anschluß an die Gewinnung des Homogenats wurde dieses im Verhältnis 1 : 40 verdünnt. Dazu wurden 50 ul des Homogenates abpipettiert, zu diesen 50 ul Homogenat 1950 ul des Phosphatpuffers (pH 7,6) zugesetzt. Somit lag für jede Probe 2 ml Arbeitsverdünnung (Verdünnung 1 : 40) vor. Durch einen zuvor durchgeführten Verdünnungstest der Hypophysenhomogenate konnte diejenige Verdünnungsstufe ermittelt werden, die im Haupt-Radioimmunoassay das Ablesen der Hormonwerte im sensitivsten Bereich der Standardkurve ermöglichte.

4.2. Radioimmunoassay (RIA) zur Bestimmung von r-LH und r-FSH

4.2.1. Theorie des Radioimmunoassay

Die Methode des RIA wurde von BERSON und YALOW (1960) für die quantitative Bestimmung des Plasma Insulins eingeführt. Seither hat sich diese Methode infolge großer Nachweisempfindlichkeit und Nachweisspezifität in der Bestimmung von Peptidhormonen, Steroidhormonen und Arzneistoffen bewährt.

Eine Übersicht über die Merkmale des RIA gibt STITES (1976): (X sei ein hypothetisches menschliches Proteohormon.)

"(1) Antiserum to X is raised in heterologous species, eg, rabbit or guinea pig.
(2) ...
(3) X is then radiolabeled, usually with ^{125}J (^{+}X).
(4) Labeled antigen ^{+}X reacts with enough antibody to bind about 70 % of ^{+}X.
(5) Various known amounts of unlabeled hormone X are added to a mixture of ^{+}X and anti-X and compete for antibody combining sites.
(6) After an appropriate incubation period, labeled ^{+}X bound to antibody is separated from unbound ^{+}X.
(7) From the amount of ^{+}X at various X concentrations ..., a curve can be constructed which will allow computation of any unknown X concentration desired ..."

((1) Bei verschiedenen Tierarten, z. B. Kaninchen oder Meerschweinchen, wird Antiserum gegen X in größeren Mengen erzeugt.
(2) ...
(3) X wird durch radioaktive Markierung zu ^{+}X. Gewöhnlich verwendet man ^{125}J.

(4) Radioaktiv markiertes Antigen ^{+}X läßt man mit einer ausreichenden Menge Antikörper reagieren, so daß um die 70 % von ^{+}X sich an den Antikörper binden.
(5) Verschiedene bekannte Mengen von nicht markiertem Hormon X werden einer Mischung von ^{+}X und Anti-X zugegeben und konkurrieren um die Antikörper-Bindungsstellen.
(6) Nach angemessener Inkubationsdauer wird das an den Antikörper gebundene markierte ^{+}X von nicht gebundenem ^{+}X getrennt.
(7) Aus der Menge ^{+}X bei verschiedenen Konzentrationen von X ... läßt sich eine Kurve erstellen, die jede beliebige gesuchte Konzentration von X abzulesen erlaubt...)

Die in Punkt (6) beschriebene Trennung von an Antikörper gebundenem markiertem Hormon von freiem markiertem Hormon erfolgte mit der Doppelantikörper-Methode:

Ein zweiter Antikörper, der gegen den ersten Antikörper und somit auch gegen den gebildeten Antigen-Antikörperkomplex gerichtet ist, fällt diesen aus. Die nach Zentrifugation im Sediment gemessene Radioaktivität läßt die Hormonkonzentration der Probe mit Hilfe der für LH und FSH getrennt zu erstellenden Standardkurven bestimmen. Eine hohe Radioaktivität des Sediments zeigt dabei an, daß wenig zu bestimmendes, nicht markiertes Hormon der Probe in den Wettbewerb um die Bindungsstellen im markierten Antigen-Antikörperkomplex eingetreten ist.

4.2.2. Durchführung des Radioimmunoassay

Für die Durchführung der radioimmunologischen Bestimmung von r-LH und r-FSH galten die Richtlinien des NATIONAL INSTITUTE OF ARTHRITIS, METABOLISM AND DIGESTIVE DISEASES (NIAMDD) RAT PITUITARY HORMONE DISTRIBUTION PROGRAM, Bethesda MD., USA.

Die Gewinnung der der RIA-Bestimmung zugrundeliegenden biologischen Proben - Serum und Hypophysenhomogenat - wurde in Kap. 4.1.6. (Serum), 4.1.8. und 4.1.9. (Hypo-

physenhomogenat) beschrieben. Die Proben für die Erstellung der Standardkurven wurden dreifach angesetzt, die Bestimmung von r-LH und r-FSH in den Serum- bzw. Hypophysenhomogenat-Proben erfolgte einfach.

Bei der Durchführung des RIA muß gleichzeitig ein Test zur Bestimmung der sog. B_0-Bindung angesetzt werden. Als B_0-Bindung wird die Bindung des radioaktiv markierten r-LH bzw. r-FSH an den Antikörper in einer nichtkompetitiven Situation, d.h. ohne die Anwesenheit des zu bestimmenden "kalten" r-LH bzw. r-FSH bezeichnet. Diese B_0-Bindung muß bestimmt werden, da das radioaktive r-LH bzw. r-FSH durch den Markierungsprozeß immunologisch verändert werden kann, und somit veränderte Bindungsverhältnisse an den Antikörper vorliegen können, außerdem stellt dies den Ausgangspunkt der Standardkurve dar, den Punkt, bei welchem die Standardhormonkonzentration Null ist.

Im einzelnen wurden nacheinander ausgeführt:

1) Es wurden für die Standardkurve 100 ul der verdünnten Reference Preparation (NIAMDD-Rat LH-RP-1 bzw. NIAMDD-Rat FSH-RP-1) in Standardverdünnungen von 2,5 ng bis 500 ng r-LH/100 ul Serum bzw. 2,5 ng bis 500 ng r-FSH/100 ul Serum pipettiert.

2) Für die Proben von unbekanntem Hormongehalt wurden jeweils pipettiert
- 100 ul Serum für die r-LH-Bestimmung im Serum
- 100 ul Serum für die r-FSH-Bestimmung im Serum
- 100 ul Arbeitsverdünnung des Hypophysenhomogenats für die r-LH-Bestimmung in der Hypophyse
- 200 ul Arbeitsverdünnung des Hypophysenhomogenats für die r-FSH-Bestimmung in der Hypophyse.

3) In drei Röhrchen wurden weder Serum bzw. Hypophysenhomogenat noch Reference Preparation-Standardverdünnung pipettiert, sondern 100 ul Diluent (siehe Materialien). Dieser Ansatz diente der Bestimmung der B_0-Bindung.

4) Die unter 1) bis 3) angesetzten Röhrchen mit Serum oder Hypophysenhomogenat oder Diluent wurden mit Diluent auf ein jeweils identisches Volumen von 300 ul aufgefüllt.

5) In jedes Röhrchen wurden 200 ul Antiserum pipettiert, und zwar
NIAMDD-Anti-Rat LH Serum-1 in einer Verdg. von 1 : 10000
NIAMDD-Anti-Rat FSH Serum-6 in einer Verdg. von 1 : 2500.
Zur Verdünnung wurde mit 3 % normalem rabbit Serum versetztes PBS verwendet.

6) Das entstandene Gemisch wurde für wenige Sekunden mit Hilfe eines Rota-mix-Gerätes aufgeschüttelt und 24 Stunden bei + 4 ^{o} Celsius inkubiert.

7) 100 ul des zuvor jodierten Hormons wurden zu dem inkubierten Gemisch hinzupipettiert, und zwar
NIAMDD-Rat LH-I-3 für LH und
NIAMDD-Rat FSH-I-1 für FSH.
Die Verdünnung wurde so gewählt, daß sich bei der Registrierung der Radioaktivität im Gammacounter Count-Werte im Bereich von 30000 pro Minute ergaben.

8) Danach wenige Sekunden Aufschütteln mit Rota-mix, dann erneute Inkubation für 24 Stunden bei + 4 ^{o} Celsius.

9) Zugabe von 200 ul Precipitating Serum for Radioimmunoassay (Anti-Rabbit Gamma-Globulin), das zuvor mit 0,01 molarem Phosphatpuffer auf das Verhältnis von 1 : 12 verdünnt wurde. Ziel der Zugabe dieses zweiten Antikörpers war es, eine maximale Präzipitation des an den ersten Antikörper gebundenen Hormons zu erreichen.

10) Erneut kurzes Aufschütteln mit Rota-mix mit nachfolgender Inkubation bei + 4 ^{o} Celsius für 72 Stunden.

11) Abschließend wurde für eine Stunde bei 4000 rpm zentrifugiert (Zentrifuge Firma CHRIST, Osterode/Harz, Typ UJ3 S). Abkippen des Überstandes und peinliches Austrocknen der Röhrchenwandung bis kurz oberhalb der oberen Begrenzung des Sediments mit einem eigens dafür hergestellten Wattestäbchen. Das nun vorliegende Präzipitat wurde 3 Minuten

in einem Gammazähler gezählt (PACKARD Auto-Gamma Szintillations-Spectrometer Nr. 5160). Dabei wurde vom Gamma-Zähler die zuvor gemessene, ständig registrierbare "Hintergrundstrahlung" (background) von dem Zählergebnis der jeweiligen Probe subtrahiert.

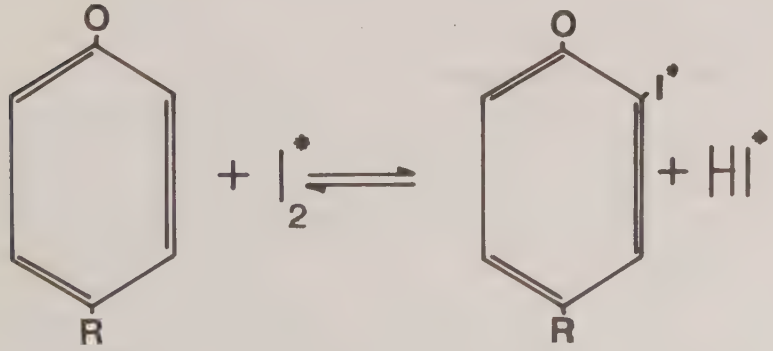
4.2.3. Jodierung des Hormones nach der Chloramin-T-Methode

4.2.3.1. Theorie der Jodierung

Eine gut eingeführte Methode der radioaktiven Markierung des Antigens, hier also der Hormone r-LH und r-FSH, ist die Jodierung mit ^{125}J oder ^{131}J. Diese Gamma-Strahler markieren das Molekül in einem Syntheseschritt. Vorteile dieses markierten Hormones sind

- eine hohe spezifische Radioaktivität und
- bei Markierung mit ^{125}J eine Halbwertzeit von 60 Tagen. (^{131}J wird heute infolge seiner kürzeren Halbwertzeit vorwiegend bei in vivo-Untersuchungen eingesetzt.)

"Die Jodmarkierung beruht auf der elektrophilen Substitution im aktivierten aromatischen Ring, z. B. im Tyrosin ortho-ständig zur Hydroxylgruppe." (ECKERT 1976)



Man muß beachten, daß die Jodmarkierung das Molekül verändern kann, auch in dessen Konformation; daraus kann sich eine Änderung der immunologischen Eigenschaften mit nachfolgender Veränderung der Bindungsfähigkeit des Antikörpers ergeben.

Bei dieser Oxidation muß beachtet werden, daß die ebenfalls bereits im Reaktionsgemisch enthaltene zu markierende Substanz möglichst wenig der oxidierenden Wirkung ausgesetzt ist. Man wählt deshalb milde Oxidationsmittel wie Chloramin T und stoppt die Reaktion schon nach einer Reaktionszeit von 60 Sekunden durch Zugabe des Reduktionsmittels Natriumdisulfit $Na_2S_2O_5$ bzw. durch Verdünnen mit Pufferlösung. Der Anteil möglicher Zersetzungsprodukte wird dadurch klein gehalten. Zusätzlich ist es notwendig, sofort nach der Markierung das radioaktiv markierte Hormon von nicht inkorporiertem ^{125}J und von radioaktiven Spaltprodukten ("damage") zu trennen. Die Trennung erfolgte durch eine Sephadex G-75-Säule.

4.2.3.2. Jodierungsanleitung

In der angegebenen Abfolge wurden pipettiert:

1) 2 ug des gereinigten r-LH (NIAMDD-Rat LH-I-3) bzw. r-FSH (NIAMDD-Rat FSH-I-1) in 20 ul PBS
2) 20 ul des 0,5 M PBS
3) 0,5 mCi ^{125}J, das entspricht 5 ul Na ^{125}J-Lösung
4) 10 ul Chloramin-T (50 mg in 20 ml 0,01 M PBS unmittelbar vorher erst gelöst)
5) Für die Dauer von genau 60 Sekunden Reaktionszeit nach Zugabe der Chloramin-T-Lösung Schütteln des Reaktionsgemisches auf Rota-mix (Fa. HOCK & TUCKER HT)
6) 30 ul Natriumdisulfit $Na_2S_2O_5$ (50 mg in 20 ml 0,01 M PBS gelöst)
7) 100 ul Transferlösung
8) Das Reaktionsgemisch wurde auf eine 10 cm lange Sephadex G-75-Säule übertragen (Säulendurchmesser 1 cm).

   Herstellung der Sephadex-Säule:

   8.1. 6 g Sephadex G-75 wurden mit 0,01 M PBS ca. 60 Minuten gekocht.

   8.2. Erkalten lassen.

8.3. Die Säule wurde 10 cm hoch eingefüllt.

8.4. Die Säule wurde mit 0,01 M PBS dreimal nacheinander gespült.

8.5. Die Säule wurde anschließend mit 2 % Rinderserumalbumin in PBS-Lösung äquilibriert.

9) Um das Reaktionsgemisch vollständig auf die Sephadexsäule zu bekommen, wurde das Reaktionsgefäß zweimal mit je 20 ul 2 % BSA-Lösung ausgespült. Die Spülflüssigkeit wurde ebenfalls auf die Sephadexsäule aufgebracht.

10) Eluieren der Sephadexsäule mit 0,01 molarem PBS.

11) Das Eluat wurde fraktioniert aufgefangen, wobei je 1 ml Eluat in je ein Gläschen mit 0,5 ml 2 % BSA-Lösung als Vorlage eingefüllt wurde.

4.2.4. Radioaktivität des jodierten Hormons. Elutionskurven für r-LH und r-FSH.

Die Messung der Radioaktivität (Einheit: counts/min) erfolgte in einem Gamma-Zähler (PACKARD Auto-Gamma Scintillation Spectrometer, Typ Nr. 5160).

Es konnte nun die sog. Elutionskurve für die Hormone r-LH und r-FSH dargestellt werden, wobei die pro aufgefangene Eluatfraktion gemessene Radioaktivität in counts/min gegen die fortlaufend durchnumerierten Fraktionsproben aufgetragen wurde.

Peak 1 (vgl. Abb. 2) der Elutionskurve entspricht der gemessenen Radioaktivität des markierten r-LH bzw. r-FSH. Peak 2 gibt die Radioaktivität von nicht umgesetztem ^{125}J und von radioaktiven Zersetzungsprodukten, insbesondere Hormonbruchstücken, wieder. Peak 2 wird auch als "Salzpeak" bezeichnet.

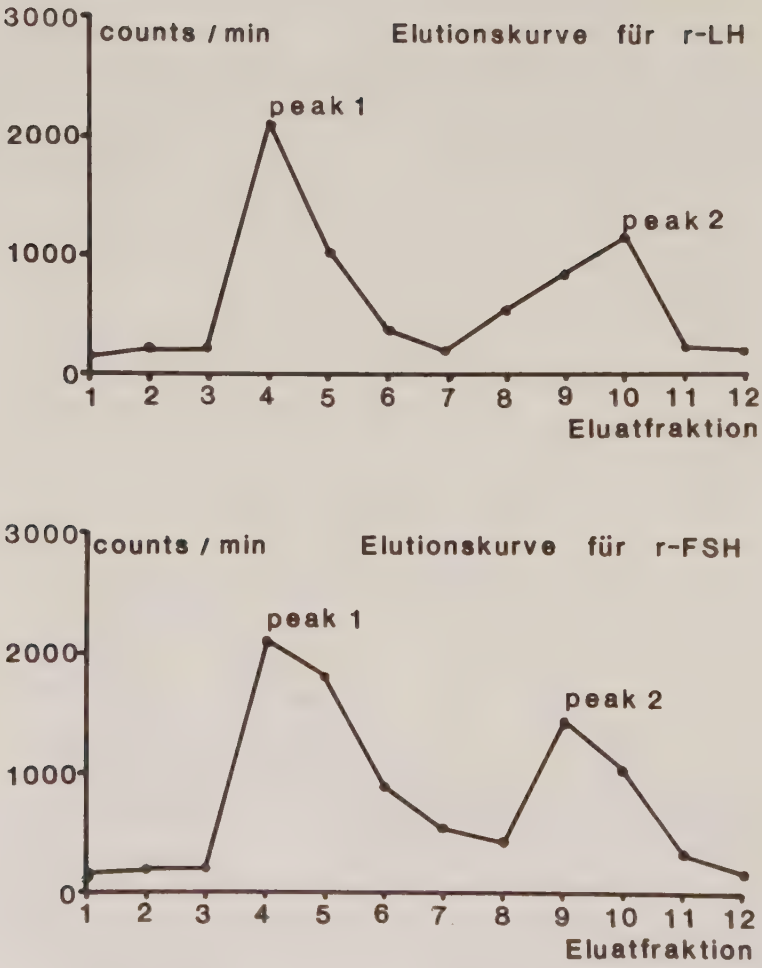


Abb. 2: Elutionskurve für r-LH (oben) und r-FSH (unten). Diese Kurven erhält man nach Trennung des Jodierungsgemisches auf einer Sephadex G-75-Säule mit Elutionspuffer. Peak 1 entspricht der gemessenen Radioaktivität des markierten r-LH bzw. r-FSH. Peak 2 ("Salzpeak") entspricht der Radioaktivität von nicht umgesetzten ^{125}J und radioaktiven Zersetzungsprodukten, insbesondere Hormonbruchstücken.

4.2.5. Standardkurven für r-LH und r-FSH

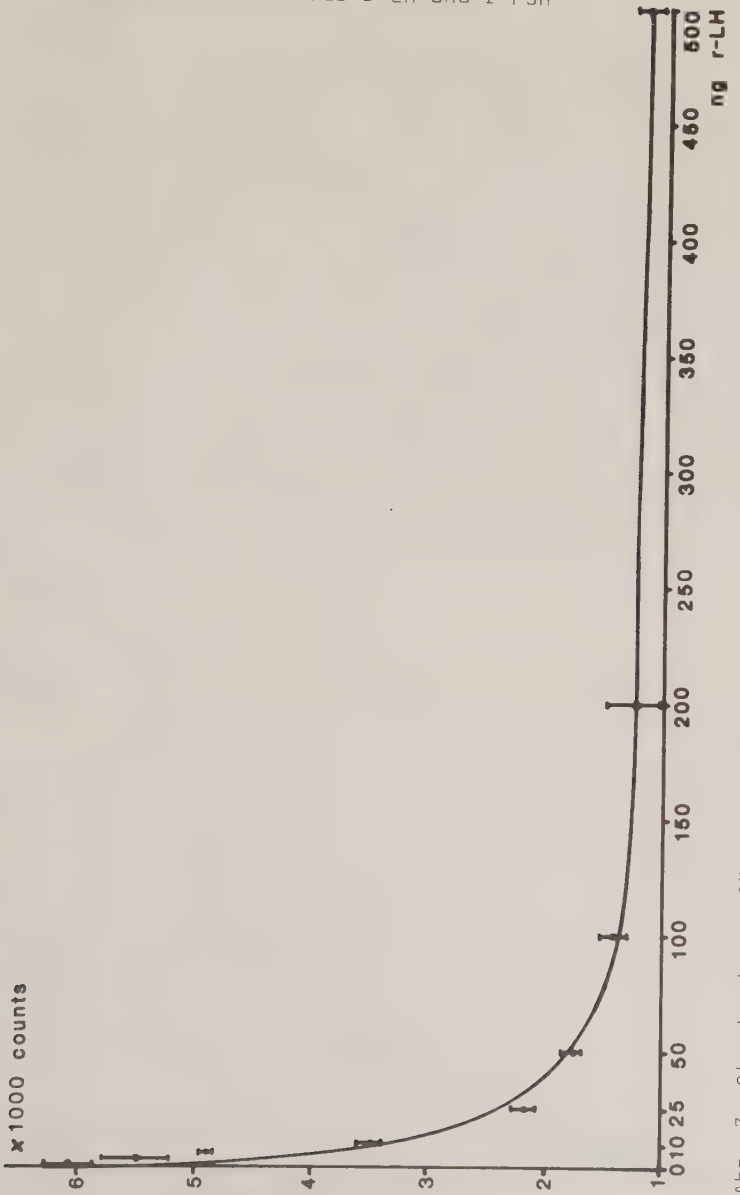


Abb. 3: Standardkurve für r-LH. Dargestellt ist die registrierte Radioaktivität in counts/3 min gegen die Standardhormonmenge.

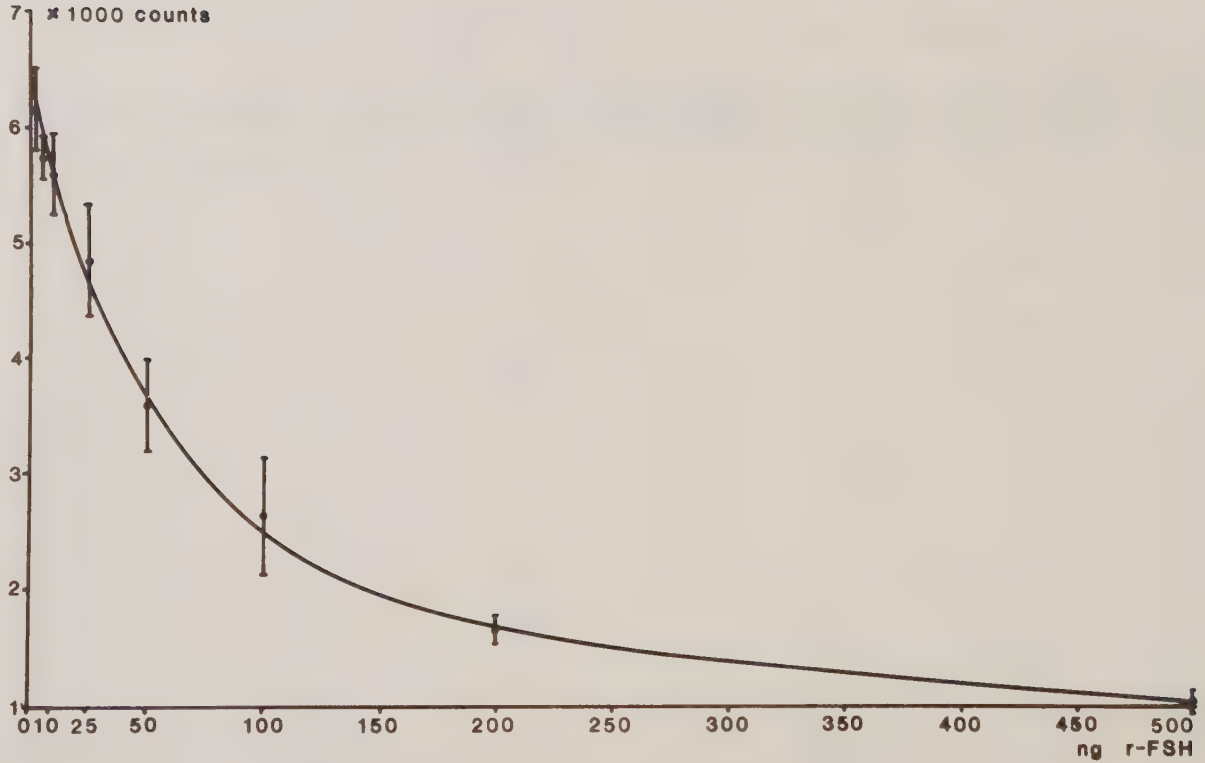


Abb. 4: Standardkurve für r-FSH. Dargestellt ist die registrierte Radioaktivität in counts/3 min gegen die Standardhormonmenge.

4.2.6. Intra- und Interassay-Variation

Ein wichtiges Qualitätsmerkmal des RIA ist seine Reproduzierbarkeit. "Aus Doppel- oder Mehrfachbestimmungen von Proben eines Assays und der dabei gefundenen Abweichung vom jeweiligen Mittelwert wird die Intra-Assay-Reproduzierbarkeit berechnet. Sie liegt normalerweise unter 5 Prozent." (ECKERT 1976) In dem hier beschriebenen Assay lag die Intra-Assay-Reproduzierbarkeit bei 7 %. "Unter Inter-Assay-Reproduzierbarkeit wird der Variationskoeffizient verstanden, der sich aus der Bestimmung derselben Probe in mehreren verschiedenen Assayansätzen unter Verwendung verschiedener Reagentien ergibt." (ECKERT 1976) Nach ECKERT soll diese Inter-Assay-Reproduzierbarkeit bei gut reproduzierbaren RIA-Bestimmungen unter 10 % liegen, lag jedoch im beschriebenen Ansatz bei 15 %.

5. Ergebnisse

5.1. Datenverrechnung

Die in den Abbildungen und im Text angegebenen Konzentrationen der Hormone LH und FSH sind sämtlich arithmetische Mittelwerte. Die Standardabweichungen (SD) werden nach der Formel

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (x_i - x)^2}{n - 1}}$$

berechnet und sind in den Abbildungen als senkrechte Striche dargestellt, wobei die Strichlänge $\pm$ 1 SD entspricht.

Die statistische Erstellung der Signifikanz der Untersuchungsergebnisse wurde mit Hilfe des SCHEFFE-Testes getroffen. Dabei wird das Signifikanzniveau mit p angegeben; p bezeichnet die Irrtumswahrscheinlichkeit für die Signifikanz des Unterschieds zweier zu vergleichender Mittelwerte. Außerdem fand der KRUSKAL-WALLIS-Test als nicht parametrischer Mehr-Stichproben-Test für unverbundene Stichproben Anwendung. Als Test für den Streuungsparameter wurde der BARTLETT-Test verwendet. Die Auswahl der geeigneten Testverfahren besorgte das Zentrum für Datenverarbeitung der Universität Tübingen.

5.2. Gewicht der Versuchstiere

Die Gewichte der Ratten wurden auf 1 g genau bestimmt.

Alter der Tiere	n	Mittleres Tiergewicht in g	Standardabweichung SD in g	SD in % vom mittl. Tiergewicht
20 Tage	70	29,87	3,14	10,5 %
35 Tage	70	85,89	5,10	5,9 %
90 Tage	70	267,56	8,21	3,1 %

Tab. 2: Gewicht der Versuchstiere.

5.3. Gewicht der Hypophysen

Das Gewicht der in toto aus den Ratten entfernten Hypophysen wurde mit einer Analysenwaage auf 0,01 mg genau bestimmt.

Alter der Tiere	n	Mittleres Hypophysengewicht (mg)	Standardabweichung SD in mg	SD in % vom mittleren Hypophysengewicht
20 Tage	70	2,72	0,55	20,2 %
35 Tage	70	4,43	0,65	14,7 %
90 Tage	70	9,12	1,34	14,7 %

Tab. 3: Gewicht der Hypophyse (in toto präpariert).

5.4. LH in Serum und Hypophyse (Abb. 5 - 7)

Bei den unbehandelten Kontrolltieren der präpubertären Altersklasse (20 Tage alt) liegen die LH-Konzentrationen im Serum unter der Nachweisbarkeitsgrenze. Über den Zeitraum von 4 Stunden zeigen die Tiere dieser Altersstufe keine signifikanten LH-Änderungen im Serum nach Gabe von L-Dopa im Vergleich zu den Tieren, die Saline erhalten haben. Es fällt auf, daß sich LH in Konzentrationen von 2,7 bis 7,2 ng/ml Serum bei den Tieren findet, die nur Saline erhalten haben, während die nicht gespritzten Tiere (Zeitpunkt Null) wie beschrieben ja keinen nachweisbaren LH-Spiegel zeigen.

In der Hypophyse dagegen sinkt der LH-Gehalt nach 15 min stetig ab, wenn 10 mg L-Dopa/100 g Körpergewicht (KG) verabreicht wird. Nach 4 Stunden findet sich bei dieser L-Dopa-Konzentration die hypophysäre LH-Konzentration mit $p = 0,026$ signifikant erniedrigt gegen die NaCl-Kontrolle. Bei einer applizierten Dosis von 1 mg L-Dopa/100 g KG findet sich isoliert nach 2 Stunden ein signifikanter Anstieg ($p = 0,03$) gegen die Kontrollgruppe, welche Saline erhalten hat.

Bei den pubertären Tieren (35 Tage alt) ergeben sich keine signifikanten Änderungen des LH-Spiegels im Serum bei Applikation von 10 mg L-Dopa/100 g KG, dagegen kommt es nach Gabe einer L-Dopa-Dosis von 1 mg/100 g KG zu einem stetigen Anstieg des LH bis auf 89 ng/100 ml Serum nach 4 Stunden. Der LH-Anstieg setzt bereits 15 Minuten nach L-Dopa-Gabe ein und ist nach 60 Minuten mit $p = 0,05$, nach 120 Minuten mit $p = 0,013$ und nach 240 Minuten mit $p = 0,015$ signifikant gegen die jeweils zeitgleiche Saline-Kontrollgruppe.

Das hypophysäre LH zeigt nach L-Dopa-Gabe keine signifikanten Veränderungen.

Die adulten Tiere (90 Tage alt) zeigen bis 1 Stunde nach L-Dopa-Gabe keine signifikanten LH-Veränderungen im Serum. Die mit 1 mg L-Dopa/100 g KG behandelten Tiere zeigen nach 2 Stunden einen mit $p = 0{,}013$ signifikanten Anstieg im Serum, der aber nach 4 Stunden nicht mehr beobachtet wird. Nach 4 Stunden zeigt sich dagegen ein mit $p = 0{,}04$ signifikanter Anstieg von LH der mit 10 mg L-Dopa/100 g KG gespritzten Tiere.

In der Hypophyse werden bei den adulten Tieren über die gesamte Beobachtungsdauer von 4 Stunden keine signifikanten Änderungen der LH-Konzentration nach L-Dopa-Gabe gefunden. Die hypophysären LH-Konzentrationen nach L-Dopa liegen aber bis auf einen Wert nach 60 Minuten sämtlich unter den LH-Spiegeln der jeweiligen Saline-Kontrolltiere.

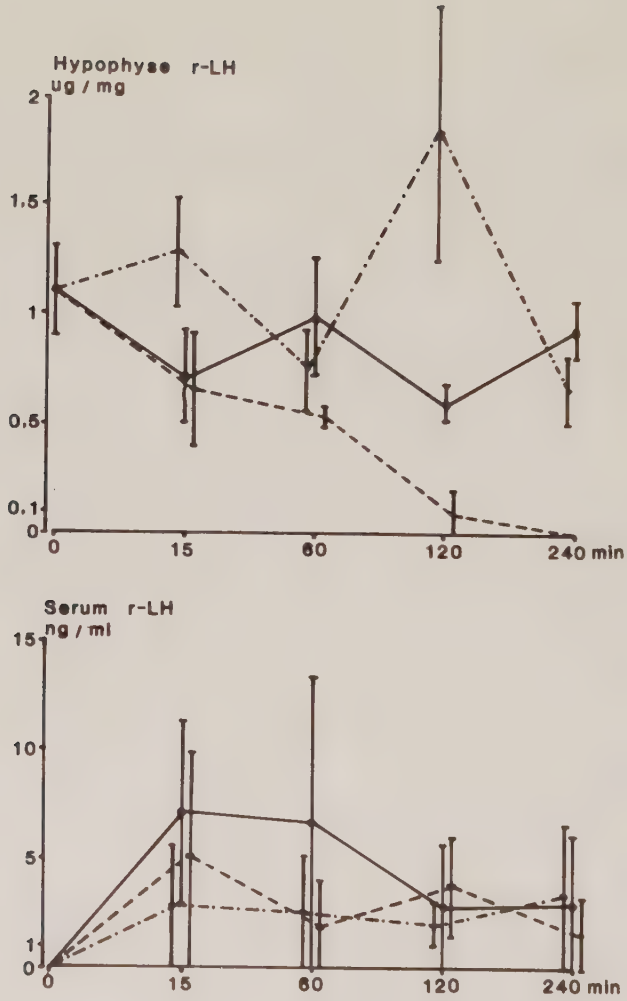


Abb. 5: 20 Tage alte Ratten.
Konzentration von r-LH in Hypophyse (oben) und Serum (unten) in Abhängigkeit von der Zeit nach Gabe von L-Dopa bzw. NaCl-Lösung und der gegebenen Dosis von L-Dopa.

——— 0,9 % NaCl-Lösung
—·—·— 1 mg L-Dopa/100 g KG
— — — 10 mg L-Dopa/100 g KG

Die senkrechten Linien geben den Bereich von ± 1 Standardabweichung an.

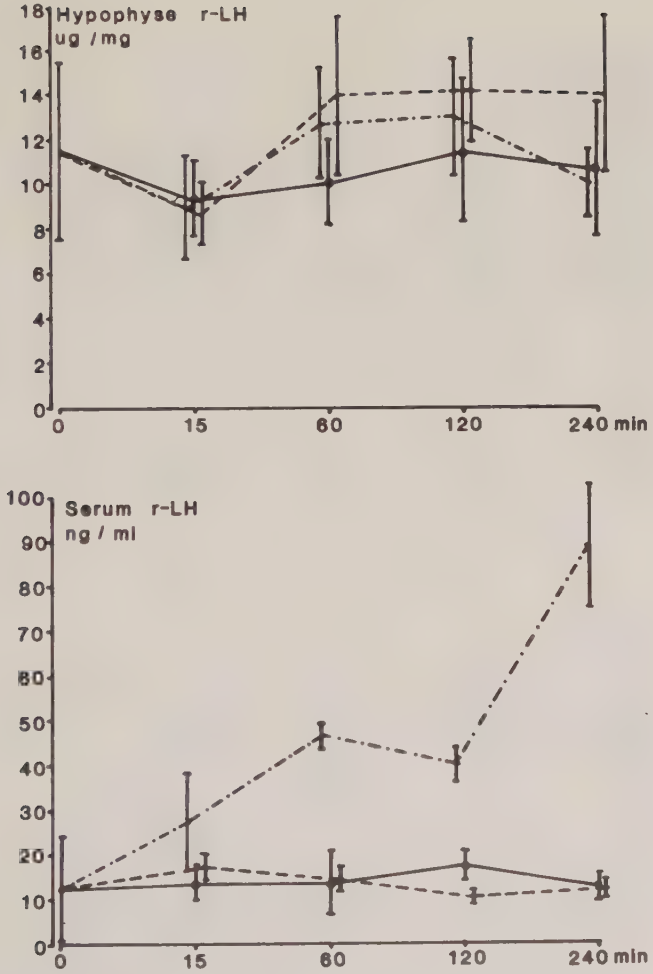


Abb. 6: 35 Tage alte Ratten.
Konzentration von r-LH in Hypophyse (oben) und Serum (unten) in Abhängigkeit von der Zeit nach Gabe von L-Dopa bzw. NaCl-Lösung und der gegebenen Dosis von L-Dopa.

——— 0,9 % NaCl-Lösung
—·—·— 1 mg L-Dopa/100 g KG
— — — 10 mg L-Dopa/100 g KG

Die senkrechten Linien geben den Bereich von ± 1 Standard-abweichung an.

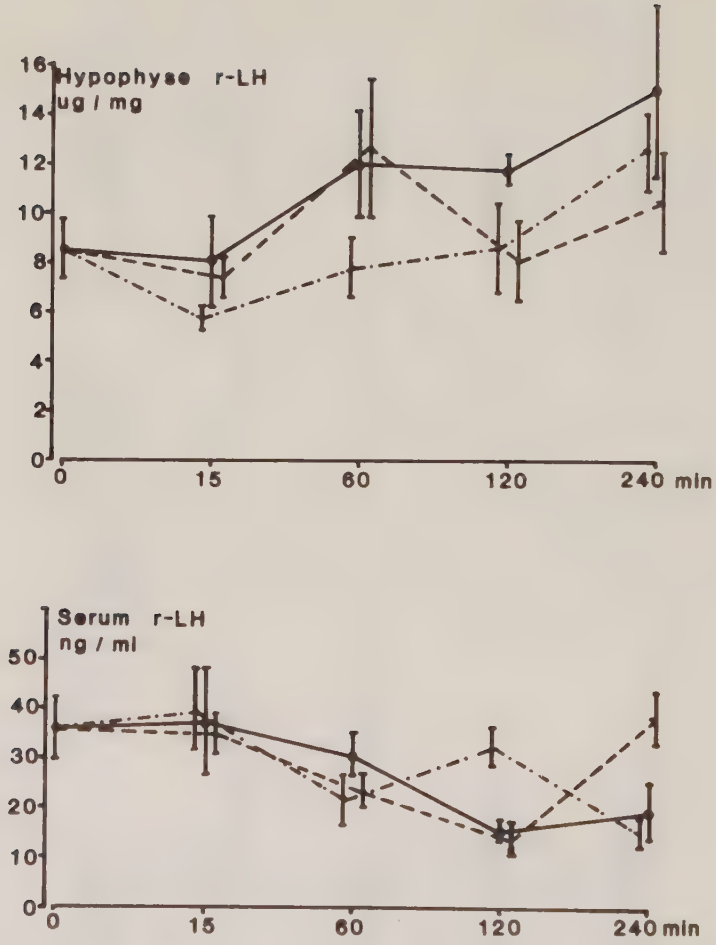


Abb. 7: 90 Tage alte Ratten.
Konzentration von r-LH in Hypophyse (oben) und Serum (unten) in Abhängigkeit von der Zeit nach Gabe von L-Dopa bzw. NaCl-Lösung und der gegebenen Dosis von L-Dopa.

——— 0,9 % NaCl-Lösung
—·—·— 1 mg L-Dopa/100 g KG
— — — 10 mg L-Dopa/100 g KG

Die senkrechten Linien geben den Bereich von ± 1 Standardabweichung an.

5.5. FSH in Serum und Hypophyse (Abb. 8 - 10)

Bei den präpubertären Tieren (20 Tage alt) findet sich 60 und 120 Minuten nach L-Dopa-Gabe unabhängig von der Konzentration ein gegen die mit Saline gespritzten Kontrolltiere erhöhter FSH-Spiegel im Serum, der aber nicht signifikant wird und sich auch nach 240 Minuten nicht mehr nachweisen läßt. Die FSH-Werte zu den genannten Zeitpunkten liegen auch im Bereich des FSH-Spiegels der nicht gespritzten Kontrolltiere.

Bei den hypophysären FSH-Werten ist ein mit $p < 0,05$ signifikanter FSH-Abfall isoliert nach 60 Minuten zu beobachten bei den mit 1 mg L-Dopa/100 g KG behandelten Tieren, sonst finden sich keine signifikanten Änderungen des hypophysären FSH-Musters.

Die pubertären Tiere (35 Tage alt) zeigen durch die L-Dopa-Gabe keine signifikanten Änderungen ihrer FSH-Werte im Serum über die gesamte Beobachtungszeit von 4 Stunden.

Die FSH-Konzentration in der Hypophyse zeigt bei den mit 1 mg L-Dopa/100 g KG behandelten Tieren einen Abfall nach 120 und 240 Minuten, der aber erst nach 240 Minuten mit $p < 0,05$ gegen die Werte bei den Saline-Kontrolltieren signifikant wird. Die höhere L-Dopa-Dosis bringt keine signifikanten Abweichungen des hypophysären FSH vom Kontrollniveau.

Bei den adulten Tieren (90 Tage alt) findet sich bei 60 Minuten ein deutlicher, nicht signifikanter FSH-Anstieg im Serum bei den mit 10 mg L-Dopa/100 g KG behandelten Tieren, mit der geringeren L-Dopa-Dosis ist bei 240 Minuten ein mit $p = 0,03$ signifikanter

FSH-Anstieg im Serum gegenüber dem 120-Minuten-Wert zu beobachten.

Das hypophysäre FSH zeigt nach 15 Minuten einen signifikanten Abfall gegenüber dem Kontrollwert der nicht gespritzten Tiere unter beiden Dosen von L-Dopa, dabei ist in beiden Fällen $p < 0,01$. Dieser Trend ist für die geringere L-Dopa-Dosis nach 240 Minuten aufgehoben, für die größere aber, mit einer Unterbrechung bei 60 Minuten, noch erhalten. So findet sich bei 240 Minuten ein mit $p = 0,03$ signifikanter Unterschied des hypophysären FSH-Spiegels zwischen den mit verschiedenen L-Dopa-Dosen behandelten Ratten.

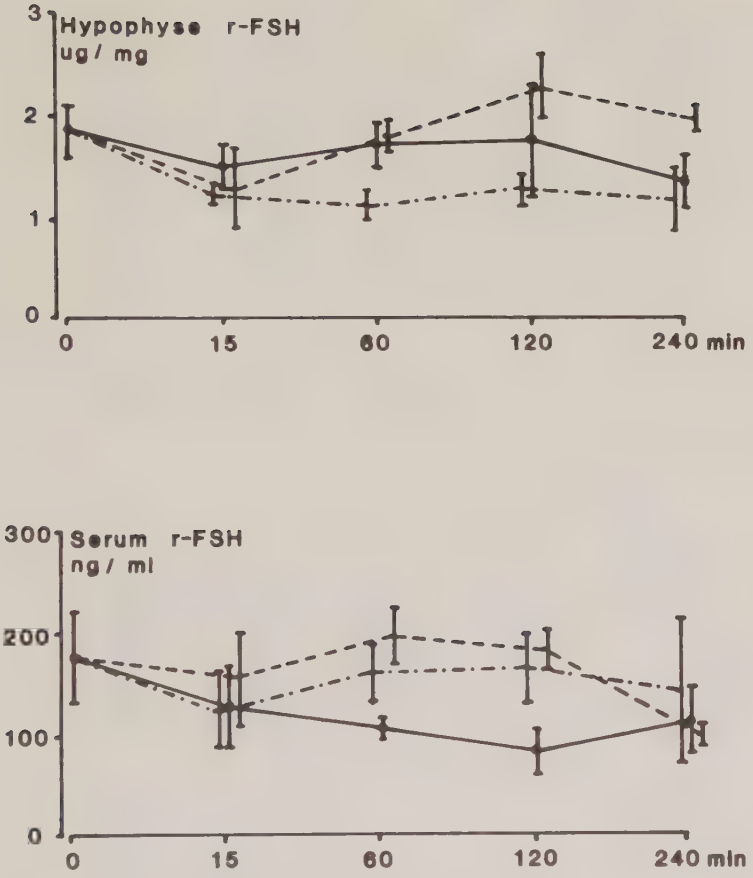


Abb. 8: 20 Tage alte Ratten.
Konzentration von r-FSH in Hypophyse (oben) und Serum (unten) in Abhängigkeit von der Zeit nach Gabe von L-Dopa bzw. NaCl-Lösung und der gegebenen Dosis von L-Dopa.

0,9 % NaCl-Lösung
1 mg L-Dopa/100 g KG
10 mg L-Dopa/100 g KG

Die senkrechten Linien geben den Bereich von ± 1 Standardabweichung an.

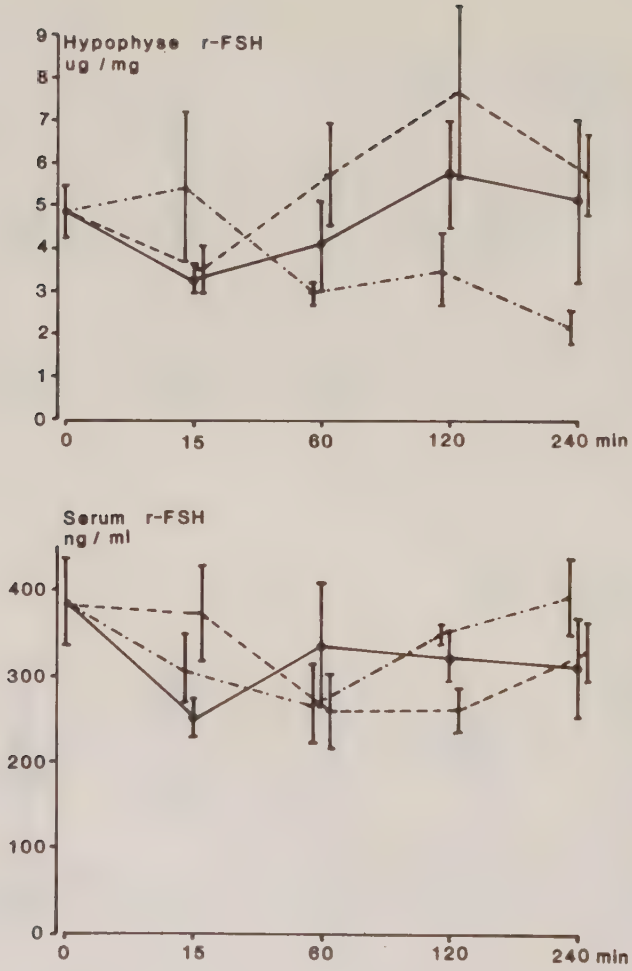
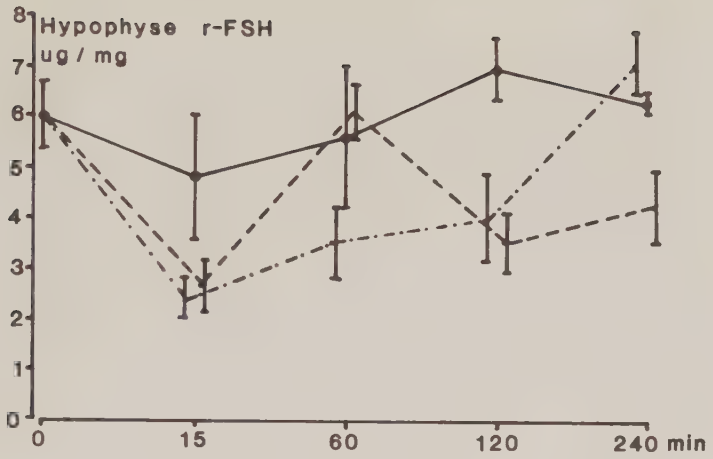


Abb. 9: 35 Tage alte Ratten.
Konzentration von r-FSH in Hypophyse (oben) und Serum (unten) in Abhängigkeit von der Zeit nach Gabe von L-Dopa bzw. NaCl-Lösung und der gegebenen Dosis von L-Dopa.

——— 0,9 % NaCl-Lösung
—·—·— 1 mg L-Dopa/100 g KG
— — — 10 mg L-Dopa/100 g KG

Die senkrechten Linien geben den Bereich von ± 1 Standardabweichung an.



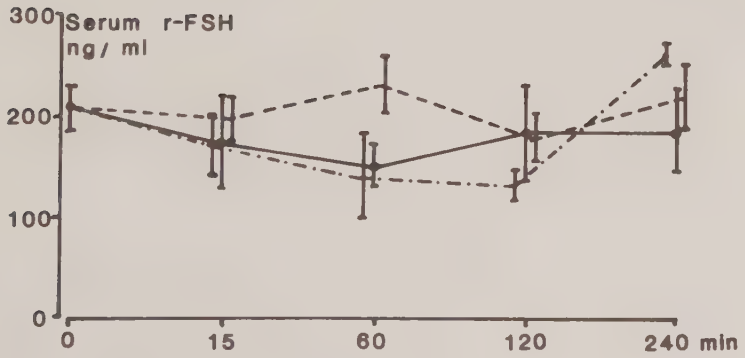


Abb. 10: 90 Tage alte Ratten.
Konzentration von r-FSH in Hypophyse (oben) und Serum (unten) in Abhängigkeit von der Zeit nach Gabe von L-Dopa bzw. NaCl-Lösung und der gegebenen Dosis von L-Dopa.

——— 0,9 % NaCl-Lösung
—·—·— 1 mg L-Dopa/100 g KG
— — — 10 mg L-Dopa/100 g KG

Die senkrechten Linien geben den Bereich von ± 1 Standardabweichung an.

5.6. FSH/LH-Relation im Serum (Tab. 4)

FSH/LH ist für die nicht-behandelte Kontrollgruppe bei den präpubertären Tieren nicht definiert, da LH unterhalb der Nachweisbarkeitsgrenze liegt. Insgesamt schwanken die Quotienten mit Werten von 16 bis 98 stark, hohe Werte finden sich besonders bei den mit L-Dopa behandelten Tieren nach 60 Minuten und 120 Minuten, bedingt durch hohe Werte für FSH. Die niedrigen FSH/LH-Relationen finden sich bei den mit Saline gespritzten Tieren.

Die pubertären Tiere zeigen im FSH/LH-Verhältnis eine kleinere Schwankungsbreite (17,6 bis 27,5), wenn sie mit der hohen Dosis L-Dopa und mit Saline behandelt wurden. Für die mit 1 mg L-Dopa/100 g KG behandelten Tiere findet sich ein Abfall von FSH/LH von 33 bei den unbehandelten Kontrolltieren bis auf 4,4 240 Minuten nach L-Dopa-Gabe. Diese nahezu kontinuierliche Abnahme des Quotienten FSH : LH ist bedingt durch die LH-Zunahme über den gesamten Beobachtungszeitraum bei FSH-Werten, die bei derselben L-Dopa-Dosis bis 60 Minuten nach Injektion abfallen, um bei 240 Minuten wieder etwa Kontrollniveau zu erreichen.

Die FSH/LH-Relationen bewegen sich bei den adulten Tieren zwischen 4,1 und 17,3. Die mit der niederen L-Dopa-Dosis gespritzten Tiere zeigen bis 120 Minuten nach Injektion Werte eng im Bereich des Kontrollniveaus (5,7), nach 240 Minuten steigt der Quotient auf 17,3 an durch FSH-Zunahme bei gleichzeitigem LH-Abfall. Nach 120 Minuten findet sich ein mit 4,1 niederer FSH/LH-Quotient durch eine inverse Situation: LH zeigt eine bei 120 Minuten isolierte Erhöhung, FSH hat zu derselben Zeit unter gleicher Vorbehandlung seinen niedersten Wert erreicht.

Alter \ Zeitpunkt nach Inj.	0		15 min	60 min	120 min	240 min
20 Tage	$\frac{177,3}{0} = \emptyset$	Dopa 1	$\frac{125,0}{2,8} = 44,6$	$\frac{160,0}{2,5} = 64,0$	$\frac{164,0}{2,0} = 82,0$	$\frac{140,0}{3,3} = 42,4$
		Dopa 10	$\frac{157,5}{5,0} = 31,5$	$\frac{196,0}{2,0} = 98,0$	$\frac{182,0}{3,8} = 47,9$	$\frac{100,0}{1,8} = 55,6$
		Saline	$\frac{130,0}{7,3} = 17,8$	$\frac{107,5}{6,7} = 16,0$	$\frac{83,3}{2,8} = 29,8$	$\frac{112,5}{3,0} = 37,5$
35 Tage	$\frac{385,8}{11,7} = 33$	Dopa 1	$\frac{308,0}{26,0} = 11,9$	$\frac{268,0}{46,3} = 5,8$	$\frac{350,0}{40,0} = 8,8$	$\frac{392,0}{89,0} = 4,4$
		Dopa 10	$\frac{374,0}{17,2} = 21,7$	$\frac{260,0}{14,8} = 17,6$	$\frac{262,5}{10,3} = 25,5$	$\frac{330,0}{12,0} = 27,5$
		Saline	$\frac{252,5}{12,0} = 21,0$	$\frac{336,7}{13,7} = 24,6$	$\frac{322,5}{17,3} = 18,6$	$\frac{310,0}{12,3} = 25,2$
90 Tage	$\frac{205,4}{36,1} = 5,7$	Dopa 1	$\frac{170,0}{39,8} = 4,3$	$\frac{138,0}{22,0} = 6,3$	$\frac{132,0}{32,6} = 4,1$	$\frac{264,0}{15,3} = 17,3$
		Dopa 10	$\frac{196,0}{35,2} = 5,6$	$\frac{232,0}{23,8} = 9,8$	$\frac{180,0}{13,6} = 13,2$	$\frac{220,0}{38,5} = 5,7$
		Saline	$\frac{172,5}{37,3} = 4,6$	$\frac{150,0}{31,0} = 4,8$	$\frac{185,0}{16,0} = 11,6$	$\frac{186,7}{19,7} = 9,5$

Tab. 4: Die Tabelle gibt das Verhältnis $\frac{\text{Serum FSH}}{\text{Serum LH}}$ unter den jeweiligen Versuchsbedingungen an. Den Werten für FSH und LH liegt der jeweilige arithmetische Mittelwert zugrunde (in ng/ml).

5.7. FSH/LH-Relation in der Hypophyse (Tab. 5)

Die mit Saline behandelten Tiere der präpubertären Altersgruppe zeigen mit hypophysären FSH/LH-Relationen von 1,51 bis 2,95 keine große Streuung; für die Tiere, die 1 mg L-Dopa/100 g KG erhalten haben, liegen die FSH/LH-Quotienten mit Werten von 0,7 bis 1,77 auch in relativ engen Grenzen, zudem im Bereich des Wertes für die Tiere der Kontrollgruppe (1,68). Dagegen zeigt FSH/LH bei Gabe der höheren L-Dopa-Dosis mit zunehmender Dauer nach Injektion steigende Werte, von 1,68 bei den Kontrolltieren bis 22,6 120 Minuten nach Injektion; nach 240 Minuten ist der Quotient nicht mehr definiert, da LH nur noch in nicht mehr nachweisbaren Mengen in der Hypophyse enthalten ist. FSH erfährt nur wesentlich geringere Abweichungen vom Kontrollniveau.

Die mit der höheren L-Dopa-Dosis behandelten Tiere der pubertären Altersstufe zeigen ebenso wie die Tiere, die Saline erhalten haben, mit FSH/LH-Relationen zwischen 0,35 und 0,53 sehr konstante Werte. 15 Minuten nach Injektion fanden sich für beide Gruppen FSH- und LH-Verminderungen in der Hypophyse, so daß die Quotienten im Bereich des Wertes für die Kontrollgruppe (0,43) blieben. Bei Gabe der niederen L-Dopa-Dosis findet sich nach 15 Minuten ein Anstieg des FSH/LH-Quotienten auf 0,61, bedingt durch nicht-signifikante FSH-Zunahme bei diskreter LH-Verminderung. Ab 60 Minuten bis 240 Minuten finden sich bei dieser Behandlung durch FSH-Abnahme bei im wesentlichen unveränderten LH-Werten niedere FSH/LH-Relationen (0,21 bis 0,27).

Für die adulten Tiere ergaben sich FSH/LH-Quotienten zwischen 0,36 und 0,71, wobei letzterer Wert für die nicht behandelten Kontrolltiere gilt. Der für beide L-Dopa-

Konzentrationen auffällig gleichsinnige Verlauf von FSH und LH in der Hypophyse ergibt relativ konstante FSH/LH-Maßzahlen.

Alter \ Zeitpunkt nach Inj.	0		15 min	60 min	120 min	240 min
20 Tage	$\frac{1,86}{1,11} = 1,68$	Dopa 1	$\frac{1,25}{1,29} = 0,97$	$\frac{1,13}{0,75} = 1,51$	$\frac{1,29}{1,85} = 0,70$	$\frac{1,17}{0,66} = 1,77$
		Dopa 10	$\frac{1,28}{0,63} = 2,03$	$\frac{1,80}{0,53} = 3,40$	$\frac{2,26}{0,10} = 22,60$	$\frac{1,96}{0} = \emptyset$
		Saline	$\frac{1,50}{0,70} = 2,14$	$\frac{1,71}{1,00} = 1,71$	$\frac{1,77}{0,60} = 2,95$	$\frac{1,36}{0,90} = 1,51$
35 Tage	$\frac{4,86}{11,32} = 0,43$	Dopa 1	$\frac{5,44}{8,93} = 0,61$	$\frac{2,97}{12,73} = 0,23$	$\frac{3,50}{13,07} = 0,27$	$\frac{2,14}{10,06} = 0,21$
		Dopa 10	$\frac{3,53}{8,67} = 0,41$	$\frac{5,72}{14,00} = 0,41$	$\frac{7,63}{14,35} = 0,53$	$\frac{5,74}{14,12} = 0,41$
		Saline	$\frac{3,26}{9,38} = 0,35$	$\frac{4,10}{10,11} = 0,41$	$\frac{5,75}{11,53} = 0,50$	$\frac{5,14}{10,64} = 0,48$
90 Tage	$\frac{6,03}{8,49} = 0,71$	Dopa 1	$\frac{2,42}{5,72} = 0,42$	$\frac{3,58}{7,82} = 0,46$	$\frac{4,01}{8,71} = 0,46$	$\frac{7,17}{12,62} = 0,57$
		Dopa 10	$\frac{2,68}{7,46} = 0,36$	$\frac{6,15}{12,69} = 0,49$	$\frac{3,57}{8,18} = 0,44$	$\frac{4,29}{10,58} = 0,41$
		Saline	$\frac{4,82}{8,15} = 0,59$	$\frac{5,62}{12,03} = 0,47$	$\frac{7,02}{11,90} = 0,59$	$\frac{6,32}{15,11} = 0,42$

Tab. 5: Die Tabelle gibt das Verhältnis $\frac{\text{Hypophyse FSH}}{\text{Hypophyse LH}}$ unter den jeweiligen Versuchsbedingungen an. Den Werten für FSH und LH liegt der jeweilige arithmetische Mittelwert zugrunde (in ug/mg).

6. Diskussion

Die Wirkung des intraperitoneal gegebenen L-Dopa auf den LH- und FSH-Gehalt in Serum und Hypophyse bei männlichen Ratten dreier Altersstufen zeigt teilweise deutliche Altersunterschiede und Konzentrationsabhängigkeit. In der Regel ist keine Parallelität zwischen Serum- und Hypophysenwerten festzustellen.

Die deutlichste positive Wirkung auf die Gabe von L-Dopa zeigten die männlichen pubertären Ratten mit einem Anstieg von 627 % nach 4 Stunden für LH. Dieser Anstieg findet sich nur im Serum und ist nur mit der niederen Konzentration des L-Dopa zu erzielen. FSH zeigt keine Abweichung im Serum zur Kontrolle bei den pubertären Tieren. In der Hypophyse kommt es nach der niederen L-Dopa-Dosis zu einem stetigen Abfall von FSH ab der sechzigsten Minute.

Bei den präpubertären Tieren zeigte sich keine signifikante Wirkung von L-Dopa auf LH und FSH im Serum. Auf hypophysärer Ebene reagieren beide Hormone. LH beginnt schon nach 15 Minuten abzufallen und erreicht nach 2 Stunden eine signifikante Erniedrigung für die hohe L-Dopa-Konzentration. FSH zeigt nach 60 Minuten einen isolierten, mit $p < 0{,}05$ gerade noch signifikanten Abfall für die niedrige L-Dopa-Konzentration.

Bei den erwachsenen Tieren bewirkt die niedere L-Dopa-Dosis nach 2 Stunden für LH einen isolierten Anstieg im Serum ($p < 0{,}02$), für die höhere L-Dopa-Dosis findet sich ein Anstieg des LH nach 4 Stunden ($p < 0{,}05$). Beim FSH erreicht nur die niedere Dosierung des L-Dopa nach 4 Stunden einen signifikanten Anstieg ($p < 0{,}04$) gegenüber dem FSH-Wert bei 2 Stunden unter gleicher Behandlung. Auf hypophysärer Ebene zeigt sich für FSH eine signifikante Verminderung ($p < 0{,}01$) unter beiden L-Dopa-Dosen nach

15 Minuten. Nach 4 Stunden liegt FSH im Hypophysengewebe unter der hohen L-Dopa-Dosis mit $p < 0{,}03$ signifikant niedriger als unter der kleineren L-Dopa-Dosis.

Der Befund, daß die Serum-Hormonwerte nur signifikante Anstiege nach L-Dopa-Gabe zeigen, stützt die Ergebnisse der im Kapitel "Literaturübersicht und Problemstellung" wiedergegebenen Ergebnisse aus in vitro-Versuchen an inkubierten Medien (KAMBERI et al. 1969; SCHNEIDER und MC CANN 1969; ROTSZTEJN et al. 1977). Auch die gefundene stimulierende Wirkung von Dopamin bei intraventrikulärer Gabe (SCHNEIDER und MC CANN 1970 a und b; KAMBERI et al. 1970) erfahren durch die hier vorgetragenen Ergebnisse eine Bestätigung. Dies ist auch deshalb von Wichtigkeit, weil HÖKFELT und FUXE (1972) die stimulierenden Effekte von L-Dopa bei intraventrikulärer Gabe eher als unspezifische Reaktion auf die intraventrikuläre Injektion gesehen haben. HÖKFELT und FUXE (1972) sahen sich bestätigt durch die Befunde von SAWYER et al. (1974): bei östrogen-vorbehandelten Ratten bewirkte Dopamin, intraventrikulär gegeben, keinen LH-Release.

Die hier gefundenen steigernden Effekte des L-Dopa, besonders auf LH bei den pubertären Ratten, bedürfen aber einer weiteren Würdigung, da SMYTHE (1977) berichtet, daß hypothalamische dopaminerge Verbindungen vorwiegend hemmend, serotoninerge Wege dagegen vorwiegend stimulierend auf die hypophysäre Hormonfreisetzung wirken.

Die von SMYTHE (1977) selbst vorgestellte "serotoninergic hypothesis" (die Annahme, daß Serotonin die am Rezeptor wirksame Substanz ist) läßt eine Deutung des in dieser Arbeit gefundenen stimulierenden Effekts von L-Dopa auf den LH-Release zu. Danach sind die durch adrenerge Substanzen erzielten Effekte primär über Serotonin-Rezeptoren vermittelt. Außerdem können Verbindungen wie L-Dopa neben ihren adrenergen Wirkungen den Gehalt und die Aktivität

von Serotonin im Gehirn entscheidend verändern (SMYTHE 1977). Die hier referierte "serotoninergic hypothesis" (SMYTHE 1977) wird indirekt von COLLU et al. (1975) bestätigt. Ihnen gelang der Nachweis, daß mit Cyproheptadin, einem Serotonin-Antagonisten, die L-Dopa-induzierte gesteigerte Sekretion von Wachstumshormon ausbleibt oder stark vermindert ausfällt (COLLU et al. 1975). Weiter ist zu bedenken, daß die O-Methylierung von Dopamin oder Serotonin zu Derivaten führt, die mit ihren Ausgangssubstanzen in kompetitiven Wettbewerb am Rezeptor treten, aber entgegengesetzte Wirkungen erzielen (SMYTHE 1977).

Dieses Modell eines serotoninergen Rezeptors für L-Dopa benutzte SMYTHE (1977) auch zur Erklärung differenter Wirkungen von L-Dopa auf das Wachstumshormon (GH):"It seemed to us that the inhibitory effect of L-dopa (i.e. dopamine) in patients with acromegaly (as well as in experimental animals) were only paradoxical as long as dopamine was considered to exert its effects on GH at dopamine receptors. Consequently we argued that the effects of dopamine on GH-secretion were the result of agonist-antagonist interactions at serotonin receptors." (SMYTHE 1977) (Es schien uns, daß die hemmende Wirkung von L-Dopa bzw. Dopamin bei Patienten mit Akromegalie (wie auch bei Versuchstieren) nur dann widersprüchlich erscheint, wenn man annimmt, daß Dopamin seine Effekte über Dopamin-Rezeptoren vermittelt. Daher brachten wir vor, daß die Wirkung von Dopamin auf die Sekretion des Wachstumshormons das Ergebnis von agonistisch-antagonistischen Wechselwirkungen an Serotonin-Rezeptoren ist.)

Die hier wiedergegebenen Vorstellungen der serotoninergen Hypothese und die Vermutung, daß Serotonin die Hypophyse in ihrer Hormonsekretion anregt, könnten erklären, daß auf hypophysärem Niveau nur Verminderungen im Hormongehalt gefunden wurden, während im Serum nur Anstiege zu verzeichnen sind.

Die ausgeprägten Erhöhungen des LH im Serum bei den pubertären Tieren verlangen eine spezielle Würdigung. Dieses Ergebnis könnte eine Entsprechung bei Ergebnissen finden, die GUPTA und EICHNER (1977) nach Applikation von LH-RH erhielten. Den größten LH-Zuwachs fanden sie bei den 35 Tage alten Tieren 10 Minuten nach LH-RH-Injektion, FSH erreichte bei den 26 Tage alten Tieren seine stärkste Zunahme, ebenfalls nach 10 Minuten. Diese Entsprechung kann als Hinweis dafür gewertet werden, daß der Neurotransmitter L-Dopa die LH-RH-Sekretion anregt und so die Gonadotropine im peripheren Blut erhöht und in der Hypophyse erniedrigt; die Sensitivität der Dopamin- oder Serotonin-Rezeptoren auf L-Dopa bzw. seine möglichen Metaboliten scheint somit altersabhängig zu sein. Die adulten Tiere zeigten sehr viel geringere und zeitlich isoliertere Anstiege von LH. Auch DONOSO et al. (1971) fanden, wie beschrieben, bei erwachsenen Ratten auf Gabe von 10 bzw. 40 mg L-Dopa/100 g Körpergewicht keine signifikanten Änderungen der LH- und FSH-Spiegel im Serum. Auch die Gabe des Releasing-Factors für das Wachstumshormon zeigte in einer Arbeit von KELCH et al. (1975) altersabhängige Gonadotropin-Veränderungen.

Der Befund der strengen Konzentrations-Abhängigkeit des LH-Anstiegs im Serum bei den pubertären Ratten ist sehr auffallend. ROTSZTEJN et al. (1977) fanden in ihren in vitro-Versuchen, daß mit steigender Dosis Dopamin ein zunehmender LH-RH-Anstieg im inkubierten Medium zu beobachten ist. In unserem Experiment war jedoch mit der höheren Dosis L-Dopa keine LH-Steigerung im Serum mehr zu erzielen. Mit der ganz anderen Versuchsanordnung der intraventrikulären Injektion von Dopamin machten KAMBERI et al. (1970) eine ähnliche Beobachtung: Für Dopamin-Dosen, die größer als 1,25 ug waren, fanden sich LH-Spiegel, die sich zur jeweiligen Dopamin-Dosis umgekehrt

verhielten; z. B. ergaben sich 20 Minuten nach der Injektion von 1,25; 2,5; 5; 10 und 100 ug Dopamin-Hydrochlorid mittlere Serum LH-Spiegel von 19,4; 16,9; 13,4; 10,3 und 1,3 ng/ml. (KAMBERI et al. 1970) Es muß derzeit offen bleiben, ob die von FUXE (1978) beschriebenen Autorezeptoren für Dopamin als Träger der negativen Rückkoppelung von Synthese und Liberation des Dopamin als Erklärung für diese Beobachtungen ausreichen.

Die Serum FSH-Spiegel veränderten sich auf L-Dopa nicht, sieht man von dem isolierten Anstieg nach 4 Stunden bei den adulten Tieren ab. Dagegen zeigen die hypophysären FSH-Werte besonders bei den pubertären und erwachsenen Tieren signifikante Erniedrigungen.

Die Unterschiede der LH- und FSH-Antwort auf L-Dopa lassen sich nicht befriedigend erklären. Ob die im Vergleich zu den LH-Zentren verzögerte Reifung der FSH-Zentren (CRITCHLOW und BAR-SELA 1967) eine Erklärung dafür abgeben kann, muß offen bleiben. Die Ergebnisse der FSH/LH-Relationen lassen auch eine andere Deutung zu. Für die pubertären Tiere ergaben sich nach Applikation von 1 mg L-Dopa/100 g Körpergewicht über den gesamten Beobachtungszeitraum fallende FSH/LH-Werte im Serum (15 Minuten: 11,85; 60 Minuten: 5,79; 120 Minuten: 8,75; 240 Minuten: 4,4). Der Wert für die nicht behandelten Kontrolltiere lag in dieser Altersgruppe bei 32,98. Diese Resultate zeigen im Zusammenhang mit den absoluten Veränderungen für FSH und LH im Serum, daß L-Dopa bei den 35 Tage alten Ratten in der Dosierung von 1 mg/100 g Körpergewicht nur die LH-Spiegel im Serum, nicht aber die FSH-Spiegel erhöhte. Mit diesem Befund läßt sich die Vermutung erhärten, daß es zwei Releasing-Faktoren für die Gonadotropine FSH und LH gibt, wobei der Releasing-Faktor für LH sehr viel stärker auf den L-Dopa-Stimulus ansprechen würde. Diese Annahme wird unterstützt durch die Ergebnisse der hypophysären FSH- und LH-Werte bei den 20 Tage alten Ratten.

Hier vermindert sich der LH-Gehalt nach Gabe der höheren Dosis L-Dopa über den gesamten Beobachtungszeitraum, während dies für FSH nicht gesehen wurde. Der FSH/LH-Quotient erhöhte sich dadurch von 1,68 (Kontrollgruppe) über 2,03 15 Minuten nach Gabe von L-Dopa, 3,4 nach 60 Minuten, 22,6 nach 120 Minuten, zu einem nicht mehr definierten Wert nach 240 Minuten (LH unter der Nachweisbarkeitsgrenze).

Bei den pubertären und adulten Tieren findet sich in der Hypophyse eine stärkere Verminderung von FSH als von LH; für die pubertären Tiere von 60 Minuten bis 240 Minuten nach L-Dopa-Gabe, für die adulten Tiere besonders nach 15 Minuten. Es muß in weiteren Arbeiten geklärt werden, ob die Vermutung einer stärkeren Wirkung von L-Dopa auf LH-RH als auf einen möglichen Releasing-Faktor für FSH den letzten Befunden widerspricht. Auffällig bleibt, daß die (mögliche) stattgefundene Freisetzung von FSH aus der Hypophyse bei den 90 Tage alten Tieren schon nach 15 Minuten beendet ist.

Kritisch bleibt festzuhalten, daß weitere Untersuchungen mehr die schon physiologischerweise festzustellenden circadianen Schwankungen der Gonadotropine in der Versuchsplanung berücksichtigen müßten, wie sie von GUPTA (1977) beschrieben wurden. Hormonmessungen von Tieren gleicher Versuchsbedingungen können um bis zu 90 % differieren, wenn die Proben zu verschiedenen Tageszeiten gewonnen wurden. In weiteren Untersuchungen sollte auch geklärt werden, ob bei längerdauernder Vorbehandlung mit L-Dopa mehr Einblick in dessen Rolle als Neurotransmitter für den Release der Gonadotropine möglich ist.

7. Zusammenfassung

Die intraperitoneale Gabe von L-Dopa an männliche Ratten verschiedener Altersstufen ergab einen signifikanten Anstieg des Serum LH bei den pubertären Tieren, der streng von der L-Dopa-Konzentration abhängig ist. Parallele Veränderungen für FSH im Serum wurden nicht gefunden, ebensowenig fand sich für den LH-Anstieg eine Entsprechung in den hypophysären Hormon-Konzentrationen. Die präpubertären und adulten Tiere zeigten diese LH-Steigerung auf L-Dopa nicht.

Die 20 Tage alten, präpubertären Tiere zeigten nach Gabe von 10 mg L-Dopa/100 g KG eine stetige LH-Verminderung in der Hypophyse. FSH fand sich bei den adulten Tieren nach 15 Minuten unabhängig von der gegebenen L-Dopa-Dosis signifikant erniedrigt.

L-Dopa scheint nach den vorliegenden Ergebnissen einen positiv stimulierenden Effekt auf die LH-Sekretion der Hypophyse zu haben, der alters- und konzentrationsabhängig ist. Dies kann als Hinweis dafür gewertet werden, daß die Triggerung des Pubertätseintritts bei der männlichen Ratte über eine veränderte Empfindlichkeit hypothalamischer oder hypophysärer Dopamin- oder Serotonin-Rezeptoren vermittelt wird. Weiterhin kann vermutet werden, daß es für die Gonadotropine LH und FSH zwei verschiedene Releasing-Faktoren gibt, wobei derjenige für LH bei den 20 und 35 Tage alten Ratten auf L-Dopa empfindlicher ansprechen würde.

8. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Seite

Abb. 1: Schema des Regelkreises der Strukturen Hypothalamus - Hypophyse und Hoden bei einem männlichen Säugetier 6

Abb. 2: Elutionskurve für r-LH (oben) und r-FSH (unten) 28

Abb. 3: Standardkurve für r-LH 29

Abb. 4: Standardkurve für r-FSH 30

Abb. 5: r-LH in Serum und Hypophyse bei 20 Tage alten Ratten 36

Abb. 6: r-LH in Serum und Hypophyse bei 35 Tage alten Ratten 37

Abb. 7: r-LH in Serum und Hypophyse bei 90 Tage alten Ratten 38

Abb. 8: r-FSH in Serum und Hypophyse bei 20 Tage alten Ratten 41

Abb. 9: r-FSH in Serum und Hypophyse bei 35 Tage alten Ratten 42

Abb.10: r-FSH in Serum und Hypophyse bei 90 Tage alten Ratten 43

Tab. 1: Anzahl der Tiere einer Altersgruppe für die jeweiligen Versuchsbedingungen 18

Tab. 2: Gewicht der Versuchstiere 33

Tab. 3: Gewicht der Hypophysen 33

Tab. 4: Verhältnis $\frac{\text{Serum FSH}}{\text{Serum LH}}$ 45

Tab. 5: Verhältnis $\frac{\text{Hypophyse FSH}}{\text{Hypophyse LH}}$ 48

9. Abkürzungen

BSA	Bovines Serumalbumin
FSH (r-FSH)	Follikelstimulierendes Hormon (der Ratte)
GH	growth hormone
HHLS	Hypophysenhinterlappen-System
HVL	Hypophysenvorderlappen
HVLS	Hypophysenvorderlappen-System
KG	Körpergewicht
LH (r-LH)	Luteinisierendes Hormon (der Ratte)
LH-RH	Luteinisierendes Hormon-Releasing-Hormon
PBS	phosphate buffer saline
RIA	Radioimmunoassay
Saline	0,9 % Natriumchlorid-Lösung
SD	Standardabweichung

10. Literaturverzeichnis

Berson, S. A., and Yalow, R. S.:
Immunoassay for endogenous plasma insulin in man.
J. clin. investig. 39, 1157 - 1175 (1960).

Bloom, F. E.:
The Role of Cyclic Nucleotides in Central Synaptic Function.
Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 74, 1 - 82 (1975).

Brown, G. M., Seeman, P., and Lee, T.:
Dopamine/Neuroleptic Receptors in Basal Hypothalamus and Pituitary.
Endocrinology 99, 1407 - 1410 (1976).

Cocchi, D., Fraschini, F., Jalanbo, H., and Müller, E. E.:
Role of Brain Catecholamines in the Postcastration Rise in Plasma LH of Prepuberal Rats.
Endocrinology 95, 1649 - 1657 (1974).

Collu, R.:
Role of Central Cholinergic and Aminergic Neurotransmitters in the Control of Anterior Pituitary Hormone Secretion.
In: Martini, L., and Besser, G. M. (ed.):
Clinical Neuroendocrinology. New York: Academic Press 1977.

Collu, R., Jéquier, J. C., Letarte, J., Leboeuf, G., and Ducharme, J. R.:
L-Dopa and Pituitary Hormone Secretion: Influence of Cyproheptadine.
Horm. Metab. Res. 7, 96 - 97 (1975).

Critchlow, V., and Bar-Sela, M. E.:
Control of the Onset of Puberty.
In: Martini, L., and Ganong, W. F. (ed.):
Neuroendocrinology. Academic Press, New York and London 1967.

Donoso, A. O., Bishop, W., Faucett, C. P., Krulich, L., and Mc Cann, S. M.:
Effects of Drugs that Modify Brain Monoamine Concentrations on Plasma Gonadotropin and Prolactin Levels in the Rat.
Endocrinology 89, 774 - 784 (1971).

Eckert, H. G.:
Die Technik des Radioimmunoassays.
Angew. Chem. 17, 565 - 574 (1976).

Eddy, R. L., Jones, A. L., Chakmakjiou, Z. H., and Silverthorne, M. C.:
Effect of Levodopa (L-Dopa) on Human Hypophyseal Trophic Hormone Release.
J. Clin. Endocr. and Metab. 33, 709 - 712 (1971).

Fuxe, K.:
The Position of Dopamine among the Biogenic Amines with Neurotransmitter Function.
Triangel 17, Nr. 1, 1 - 11 (1978).

Fuxe, K., and Hökfelt, T.:
Participation of Central Monoamine Neurons in the Regulation of Anterior Pituitary Function with Special Regard to the Neuro-Endocrine Role of Tubero-Infundibular Dopamine Neurons.
In: Bargmann, W., and Scharrer, B. (ed.):
Aspects of Neuroendocrinology, 192 - 205, Berlin, Heidelberg, New York: Springer 1970.

Fuxe, K., Goldstein, M., Hökfelt, T., Jonsson, G., and Lidbrink, P.:
Dopaminergic Involvement in Hypothalamic Function: Extrahypothalamic and Hypothalamic Control. A Neuroanatomical Analysis.
Adv. Neurol. 5, 405 - 419 (1974).

Greenwood, F. C., Hunter, W. M., and Glover, J. S.:
The preparation of J^{131} labelled human growth hormone of high specific radioactivity.
Biochem. J. 89, 114 - 123 (1963).

Grobecker, H., Hellenbrecht, D., and Palm, D.:
Adrenalin und Noradrenalin; Sympathomimetische und sympatholytische Pharmaka.
In: Forth, W., Henschler, D., and Rummel, W.:
Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.
Mannheim, Wien, Zürich: Bibliographisches Institut 1975.

Gupta, D.:
Hypothalamic Control of the Mammalian Sexual Maturation.
Pädiatrie und Pädologie. Pädiatrie Suppl. 5, 0/10, 53 - 60 (1977).

Gupta, D., and Eichner, M.:
Age Related Changes in Pituitary Responsiveness to Luteinizing Hormone-releasing Hormone in the Male Rat.
Res. exp. Med. 68, 1 - 5 (1977).

Hayek, A., and Crawford, J. D.:
L-Dopa and Pituitary Hormone Secretion.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 34, 764 - 766 (1972).

Hökfelt, T., and Fuxe, K.:
Effects of Prolactin and Ergot Alkaloids on the Tubero-Infundibular Dopamine (DA) Neurons.
Neuroendocrinology 9, 100 - 122 (1972).

Kamberi, I. A., Mical, R. S., and Porter, J. C.:
Luteinizing Hormone-Releasing Activity in Hypophyseal Stalk Blood and Elevation by Dopamine.
Science 166, 388 - 390 (1969).

Kamberi, I. A., Mical, R. S., and Porter, J. C.:
Effect of Anterior Pituitary Perfusion and Intraventricular Injection of Catecholamines and Indoleamines on LH Release.
Endocrinology 87, 1 - 12 (1970).

Kelch, R. P., Clemens, L. E., Markovs, M., Westhoff, M. H., and Hawkins, D. W.:
Metabolism and Effects of Synthetic Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) in Children and Adults.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 40, 53 - 61 (1975).

Leblanc, H., Lachelin, G. C. L., Abu-Fadil, S., and Yen, S. S. C.:
Effects of Dopamine Infusion on Pituitary Hormone Secretion in Humans.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 43, 668 - 674 (1976).

Monroe, S. E., Parlow, A. F., and Midgley jr., A. R.:
Radioimmunoassay for Rat Luteinizing Hormone.
Endocrinology 83, 1004 - 1012 (1968).

Moore, C. R., and Price, D.:
Gonad hormone functions and the reciprocal influence between gonads and hypophysis with its bearing on the problem of sex hormone antagonism.
Am. J. Anat. 50, 13 - 71 (1932).

Nowakowski, H.:
Erkrankungen des Hypothalamus-Hypophysen-Systems.
In: Gross, R., and Schölmerich, P. (ed.):
Lehrbuch der Inneren Medizin. 5. Aufl. Stuttgart, New York: Schattauer 1977.

Rotsztejn, W. H., Charli, J. L., Pattou, E., and Kordon, C.:
Stimulation by Dopamine of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LHRH) Release from the Mediobasal Hypothalamus in Male Rats.
Endocrinology 101, 1475 - 1483 (1977).

Sawyer, C. H., Hilliard, J., Kanematsu, S., Scaramuzzi, R., and Blake, C. A.:
Effects of Intraventricular Infusions of Norepinephrine and Dopamine on LH Release and Ovulation in the Rabbit.
Neuroendocrinology 15, 328 - 337 (1974).

Schneider, H. P. G., and Mc Cann, S. M.:
Possible Role of Dopamine as Transmitter To Promote Disharge of LH-Releasing Factor.
Endocrinology 85, 121 - 132 (1969).

Schneider, H. P. G., and Mc Cann, S. M.:
Mono- and Indolamines and Control of LH Secretion.
Endocrinology 86, 1127 - 1133 (1970 a).

Schneider, H. P. G., and Mc Cann, S. M.:
Release of LH-Releasing Factor (LRF) Into the Peripheral Circulation of Hypophysectomized Rats by Dopamine and Its Blockage by Estradiol.
Endocrinology 87, 249 - 253 (1970 b).

Smythe, G. A.:
The Role of Serotonin and Dopamine in Hypothalamic - Pituitary Function.
Clinical Endocrinology 7, 325 - 341 (1977).

Stites, D. P.:
Laboratory Methods for Detection of Antigens and Antibodies.
In: Fudenberg, H. H., Stites, D. P., Caldwell, J. L.:
Basic and clinical immunology. Los Altos (California), 281 - 315 (1976).

Watkins, B. E., Mc Kay, D. W., Meites, J., and Riegle, G.D.:
L-Dopa Effects on Serum LH and Prolactin in Old and Young Female Rats.
Neuroendocrinology 19, 331 - 338 (1975).

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. D. Gupta für die Überlassung des Themas und die Betreuung der Arbeit. Besonderen Dank sagen möchte ich auch Herrn Dipl.-Biologen Manfred Eichner für seine freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Hormonbestimmungen und seinen allzeit gewährten Rat.
Die statistische Auswertung der Ergebnisse übernahm dankenswerterweise das Zentrum für Datenverarbeitung der Universität Tübingen.

Lebenslauf

Am 1.2.1953	wurde ich, Martin Dompert-Schülke, geb. Dompert, als Sohn des Malermeisters Walter Dompert und seiner Ehefrau Ilse, geb. Straub, in Stuttgart-Bad Cannstatt geboren.
1960 - 1964	Besuch der Volksschule in Stuttgart-Gaisburg
1964 - 1966	Besuch der Raichberg-Mittelschule in Stuttgart-Ost
1966 - 1972	Besuch des Wirtemberg-Gymnasiums in Stuttgart-Untertürkheim mit abschließender Reifeprüfung
WS 1972/73	Studium der Psychologie an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen
SS 1973	Studium der Medizin an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen
Juli 1973 - Oktober 1974	Zivildienst am Katharinenhospital in Stuttgart
WS 1974/75	Wiederaufnahme des Medizinstudiums in Tübingen
März 1976	Ärztliche Vorprüfung
März 1977	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
März 1979	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 1979 - März 1980	Praktisches Jahr am Universitätsklinikum Tübingen mit Wahlfach Kinderheilkunde
24. April 1980	Abschluß des 3. Abschnitts der Ärztlichen Prüfung an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen